

IS DE BACTERIOPHAAG
EEN BACTERIEPRODUCT?

C. R. Ritsema van Eck

1931

IS DE BACTERIOPHAAG EEN
BACTERIEPRODUCT ?

IS DE BACTERIOPHAAG EEN BACTERIEPRODUCT?

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
RIJKS-UNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
Dr. J. J. BLANKSMA, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
VOOR DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE
TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 16 DE-
CEMBER 1931, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

CORNELIS ROBERT RITSEMA VAN ECK
GEBOREN TE SEMARANG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

*Aan mijn vrouw en
mijn kleine dochter.*

Bij het verschijnen van dit proefschrift is het mij een behoefte U, Hooggeleerde Flu, Hooggeachte Promotor, dank te zeggen voor de wijze, waarop gij leiding hebt willen geven aan mijn werk. Gij hebt mij niet slechts in de gelegenheid gesteld dit werk te verrichten, doch mij ook daadwerkelijk gesteund. Niet in 't minst door Uw strenge, maar opbouwende kritiek. Moge ik in de toekomst steeds Uw voorbeeld voor oogen houden.

Tevens grijp ik deze gelegenheid aan om U, Hooggeleerden van de Medische en Natuurphilosophische faculteiten der Utrechtsche Universiteit, mijn erkentelijkheid te betuigen voor het van U genoten onderwijs.

Verder dank ik allen, die mij bij mijn werk behulpzaam zijn geweest.

INLEIDING

Van de vele onderzoekers, die het probleem van de bacteriophagie hebben ter hand genomen, zijn er slechts weinigen, die zich met de theorie van d' H é r e l l e kunnen vereenigen.

Reeds dadelijk bij zijn eerste onderzoekingen heeft d' H é r e l l e de bacteriophagag beschouwd als een autonoom, levend wezen en op deze hypothese heeft hij zijn theorie gebouwd. Ik voor mij kan niet anders, dan hem voorloopig nog gelijk geven.

Zoolang wij geen andere criteria voor het leven hebben, moet een organisme, dat aan deze criteria voldoet, volgens mij, ook als levend beschouwd worden.

Tot deze criteria mag toch zeker gerekend worden de autonomie van het individu, het aanpassingsvermogen, de variabiliteit, en de mogelijkheid zich te vermenigvuldigen. Aan al deze eischen voldoet de bacteriophagag en juist het feit dat hij al deze eigenschappen tegelijkertijd bezit, is voor mij nog het sterkste argument voor de levende natuur van de phaag.

Hoewel niet duidelijk in de literatuur vermeld, zijn er toch aanwijzingen, dat in de laatste jaren velen meer en meer ertoe overhellen deze levende natuur te erkennen. (H a d l e y, B u r n e t, B a i l e.a.). Zij komen hiermee in een bijzondere moeilijkheid, daar zij op dit punt met d' H é r e l l e van meening verschillen, dat de bacteriophagag een bacterievreemd wezen is.

Is dit waar, n.l. dat de phaag tot de bacterie behoort, dan heeft men hier een phenomeen, dat onze biologische opvatting over erfelijkheid ernstig geweld aandoet.

Verscheidene onderzoekers hebben deze moeilijkheden gevoeld. De meesten zijn hen uit den weg gegaan, in de hoop, dat de loop der tijden hierin licht zou brengen, anderen zijn gaan filosofeeren over het leven en zijn kenmerken en trachten langs wijsgeerigen weg tot een oplossing te komen. Ik geloof,

dat de eersten het juiste standpunt hebben ingenomen. Slechts feiten kunnen in absoluten zin overtuigen.

Daarom wil ik in de eerste plaats zoeken naar de herkomst van de bacteriophagaag en schaar mij in de gelederen van hen, die niet meer vragen: „Leeft de bacteriophagaag of leeft hij niet?“, doch die voorloopig slechts een beslissing willen zien betreffende 't probleem: Bacterie-eigen of bacterie-vreemd.

LITERATUUR OVERZICHT

In dit overzicht wil ik mij hoofdzakelijk beperken tot de literatuur over dit gedeelte van 't probleem, die geschreven is na 1923. Hoewel de dissertatie van P o n d m a n als beginpunt voor dit proefschrift is gekozen, heb ik niet bedoeld een vervolg op zijn werk te geven.

P o n d m a n (60) heeft getracht bacteriophag uit reinculturen te kweken. Het woord reincultuur heeft hij opgevat in bacteriëelen zin. De door hem medegedeelde positieve resultaten beschouwt hij, op grond van experimenten, die aantoonde dat alleen dan positieve resultaten bereikt werden indien de proef verricht werd met bacterien waarvan het bekend was, dat zij lysogeen waren, als veroorzaakt te zijn door 't werken met mengculturen van bacteriën en bacteriophagen.

Splijts ik de verschillende opvattingen, die zich daarna hebben gehandhaafd, dan komen als voornaamste naar voren, de opvattingen van Bordet en Ciuca, Bail, Lisbonne en Carrère, Borchardt en in de laatste jaren eenige theoriën, waarvan ik zou willen zeggen, dat zij een ontstaan van de bacteriophag tengevolge van groeiomstandigheden bepleiten. Hiertoe zou ik willen rekenen de experimenten van Hadley en Plantureux in de eerste plaats, doch verder die van de verschillende auteurs, die schrijven over verouderen, toevoegen van zouten, immuunsera, filtratie's enz. Deze laatste groep is misschien te beschouwen als een voortzetting van de vondsten van Otto, Munter, Winkler, Gildemeister, Bail e.a. die melding maken van het verkrijgen van een overentbaar lytisch principe uit oude bouillon culturen.

Ik zal deze groep het laatste bespreken, omdat mijn proeven zich hierin laten onderbrengen.

Geheel apart hiervan staan de proeven van den Dooren de Jong. Ik wil niet ontkennen, dat zijn idee niet nieuw is en niet reeds door anderen voor hem is uitgevoerd (P i c o),

doch de experimenten van zijn voorgangers zijn niet door een ieder bevestigd hetgeen wel het geval is met zijn proefnemingen.

De theorie, die de gemoederen wel het minst in beweging heeft gebracht, is die van *Lisbonne* en *Carrère*, die van het bacteriëel antagonisme.

Deze onderzoekers hebben een bacteriophag verkregen uit een colicultuur, die zij samen met een shiga cultuur lieten groeien. De coli, noch de shigacultuur, hadden, ieder voor zich, phaag geproduceerd. Pas het samenbrengen had de phaag doen ontstaan.

De voornaamste tegenwerping is geweest en gebleven, dat deze onderzoekers niet met „ultra reine” culturen hebben gewerkt, zooals *Beckerich* en *Hauduroy* dadelijk hebben opgemerkt.

Een van de weinige aanhangers is nog *da Costa Cruz* (14). Gebruik makende van de vondst, dat lysogene bacterien in homoloog anti-bacterieelserum gekweekt, hun lysogeniteit verliezen, kweekt hij de colistam van *Lisbonne* en *Carrère* op deze manier en gaat na of de stam het productievermogen voor de Shigaphag verliest.

De cultuur verliest na eenigen tijd zijn phaag voor de coli, doch zelfs nog na vijftien passages in een milieu, rijk aan antilichamen, is het vermogen een Shigaphag te produceeren behouden.

Hierin vindt hij een aanleiding om een onderscheid aan te nemen tusschen de productie van de Shigaphag door de bacil van *Lisbonne* en *Carrère* en de productie van phagen, die oplossend werken op den homologen stam. Hij is dus nog steeds overtuigd van het ontstaan van bacterieophag door bacterieel antagonisme.

Tot een geheel andere conclusie komt *Muckenfusz* (50), die, uitgaande van de gedachte, dat de culturen van *Lisbonne* en *Carrère* besmet waren, nu zijn stammen experimenteel contamineert met phaag en met deze stammen een getrouwe afbeelding kan geven van de oorspronkelijke proeven. Deze experimenten haal ik even aan om de wijze waarop hij aantoonde de oorspronkelijke phaag terug te hebben gekregen.

Hij immuniseert konijnen met de oorspronkelijke, phaaghoudende

dende vloeistof en identificeert met dit serum het herwonnen lytisch principe. Hij is er dus van overtuigd dat de bacteriophag, als antigeen werkzaam is en een antiphaag kan doen ontstaan.

Als dus M c k i n l e y met het antiserum, dat hij gemaakt heeft door konijnen met de stam van L i s b o n n e en C a r r è r e te immuniseeren, de phaagwerking kan opheffen, ziet hij hierin een bevestiging van zijn meening, dat de phaag in de stam reeds aanwezig is geweest.

Een volgend vermeldingswaard feit vond ik in de publicaties van B o r d e t (5) en L i s b o n n e en C a r r è r e (47), gepubliceerd kort na de eerste onderzoeken van de beide laatsten. B o r d e t, die de lysogeniteit van één der oorspronkelijke stammen, hem door L i s b o n n e en C a r r è r e toegestuurd, aantoonde, vond bij uitstrijken, dat deze stam uit koloniën bleek te bestaan, die het lytisch principe herbergden en uit koloniën, die in het geheel geen werking lieten onderkennen. Na $\pm$ 8 maanden kweeken van één van deze laatste, trad plotseling weer het vermogen op, een Shigastam tot lysis te brengen. B o r d e t verklaart dit verschijnsel, door te veronderstellen dat de bacteriophagproductie een eigenschap van de bacterie is in een bepaalde phase van de evolutie. Gewoonlijk zal deze eigenschap ongemerkt voorbijgaan. Brengt men echter een bacteriesoort in contact met een cultuur die veel gevoeliger is voor het lyseerend agens, dan brengt deze cultuur het verschijnsel aan het licht. Op deze wijze stelt hij zich de rol van de Shigastam voor in de proeven van L i s b o n n e - C a r r è r e.

De mededeeling, wat betreft het wederoptreden van het lyseerend vermogen, bevestigen L i s b o n n e en C a r r è r e (47) en vullen haar aan met een gelijk geval in hun eigen laboratorium.

Deze vondsten duiden dus op een ontstaan uit de bacterie zelf.

De proeven van B o r c h a r d t (10) zijn de eerste van een serie, die het principe willen doen ontstaan, tengevolge van den invloed van verschillende proteolytische fermenten uit de darm. B o r c h a r d t komt tot zijn resultaten, door konijnen te voederen met culturen. In deze culturen, zoowel als in de faeces

van de proefdieren, was van te voren geen phaag aan te toonen. Hij neutraliseert eerst het maagzuur, opdat de gevoederde culturen zoo min mogelijk beschadigd in de darm arriveeren. Naar aanleiding van de vondst van bacteriophagen gaat hij na, in welk deel van de darm zij worden gevormd en komt dan tot de conclusie, dat dit in het duodenum geschiedt, en dat actief trypsine de oorzaak is. Theoretiseerend, denkt hij zich, dat het trypsine in daarvoor gevoelige kiemen een soortgelijk ferment losmaakt.

Een directe kritiek op deze proeven oefent Keller (44) uit, die aantoonst, dat het gevonden lysine reeds in het duodenum aanwezig was. Wat betreft latere publicaties omtrent positieve resultaten met tryptische praeparaten uit den handel, komt hij tot de slotsom, dat deze vondsten te wijten zijn aan verontreinigingen.

Ook Flu (21), die de experimenten van Borchardt volgens de letter heeft herhaald, komt tot geheel dezelfde conclusies als Keller. De eenige bevestiging van de proeven van Borchardt vond ik bij Gjorup (29).

Deze proeven passen in de reeks, uitgevoerd met proteolytische fermenten. Een reeks, die zich voor Borchardt uitstrekt en ook na hem, tot heden ten dage toe zich heeft uitgebreid. Wel niemand zal meer denken, dat in het ferment de oorzaak schuilt van het phenomeen van d'Hérelle, doch zeer dikwijls wordt de trypsine gebruikt om het cultuurmilieu een invloed te doen uitoefenen op de bacteriegroei.

Hoder en Suzuki (42) vervolgen deze onderzoeken na den strijd tusschen Pico, Bachman en Aquino, contra Combiesco. Regelmatig gelukt het hen door middel van pancreas-extracten uit culturen bacteriophaga te winnen. Daarop controleeren zij de extracten en wel op een zeer origineele wijze. Hun redeneering is als volgt: Is het agens een ferment, dan is het dus opgelost in de vloeistof aanwezig en is het aantoonen van de lytische werking een kwestie van hoeveelheid. Is daarentegen de corpusculaire natuur een feit, dan zal de eene druppel een lichaampje kunnen bevatten en de andere niet, zoodat deze eerste druppel dezelfde werking zal kunnen uitoefenen als het geheel. Ongeveer dus dezelfde opzet, als bij de titratie methode van Appelmans.

Deze bepaalt immers de virulentie van een bacteriophagen-suspensie door een reeks bouillonbuisjes te nemen met 9 cc bouillon. Aan de eerste buis voegt hij 1 cc suspensie toe, mengt zorgvuldig en brengt nu uit dit buisje 1 cc over in het tweede. Zoo gaat hij voort. Nu voegt hij aan alle buisjes een gelijke hoeveelheid bacterien toe en gaat na, in welk buisje nog oplossing plaats heeft.

Herhaalt men dit experiment, dan kan men voor het geval komen te staan, dat b.v. buis No. 9 helder is, No. 10 troebel en No. 11 weer helder. Dit is alleen te verklaren uit de corpusculaire natuur van de bacteriophagaag en wel op de wijze zooals *Hoder* en *Suzuki* dit hebben uitgelegd.

Uit het onderzoek blijkt, dat inderdaad het optreden onafhankelijk is van de hoeveelheid trypsine.

Deze onderzoekingen zijn voor *Pfalz* (61) een aanleiding om „Pankreon“, het preparaat van *Hoder* en *Suzuki* (42), te gebruiken in zijn experimenten. Bij onderzoek naar de herkomst van een meningococcen-bacteriophagaag is hij n.l. tot de conclusie gekomen, dat hiervoor de ascitis-vloeistof, waarmee de voedingsbodems zijn bereid, aansprakelijk moet worden gesteld. Daar hij met verschillende onspecifieke celbeschadigende middelen niet tot dezelfde resultaten kan komen, moet de werking zijn ontstaan vinden in een darmferment. Hiervoor neemt hij dan „Pankreon“.

Inderdaad vormt zich een bacteriophagaag tegen de meningococcen. Uit Pankreon alleen is deze bacteriophagaag niet te verkrijgen, bovendien is de phaag in zijn werking zeer specifiek. Hieruit concludeert hij dat het phenomeen in twee deelen behoort te worden gesplitst: ten eerste een onspecifieke fermentatieve prikkelingsphase door lichaamssubstanties, die, ten tweede, een specifieke autolytische phase bij de bacteriën verwekken. De virus-natuur acht hij hierom zeer onwaarschijnlijk. Zooals blijkt een opvatting, die aardig op die van *Kabeshima* begint te lijken.

Ook *Wolff* (73) bestrijdt de mogelijkheid, dat de tryptische werking de oorzaak zou zijn van het ontstaan van bacteriophagaag uit bacterien en wel op grond van de volgende proeven.

Hij kweekt met eenzelfde typhusstam en verschillende trypsine praeparaten, verschillende bacteriophagen; in zoover, dat

het alle typhusphagen zijn, doch hun oplossend vermogen tegenover andere stammen is verschillend en, wat voornamer is, dit is constant. Bovendien merkt hij op, dat men er met pancreaspreparaten slechts in is geslaagd, bacteriophagen te verkrijgen voor darmbacterien. P f a l z heeft aangetoond, dat dit laatste niet waar is.

Na het voorgaande, doen de publicaties, die het trypsine een remmende factor toekennen eenigszins eigenaardig aan. W o l l m a n n (71) gaat zelfs zoo ver te constateeren, dat een bacteriophaghoudende suspensie, gekweekt met trypsine, zijn werking verliest en dat de phaag verdwijnt.

B o r d e t (3, 4, 6, 7) heeft zijn opvatting in de loop der tijden eenigszins aangepast aan de feiten. Zijn oorspronkelijke opvatting van de „viciation nutritif héréditaire", waarbij de oorzaak van de viciatie een leucocytaire exsudaat zou zijn, was onhoudbaar, zooals d' H é r e l l e heeft aangetoond. Immers kan er nooit sprake zijn van heriditeit, waar geen progenituur is en bij de lysis worden alle bacterien vernietigd, zoodat het toegevoegde lysaat geen overerfelijke eigenschappen kan overbrengen.

Daarom kent B o r d e t nu de eigenschap lysine te vormen toe aan elke bacterie. De eigenschap wordt in de cel in evenwicht gehouden. Er is een uitwendige factor noodig om dit evenwicht te verstoren en de lysis manifest te doen worden.

In de „Annales de l'Institut Pasteur" van '25 en '28 geeft hij nog eens een uitgebreide uiteenzetting van zijn ideeën. In een critische studie laat hij de feiten de revue passeeren en geeft aan hoe deze verschijnselen door d' H é r e l l e met de theorie van 't ultraviolette virus worden verklaard en hoe of hijzelf ze wenscht te interpreteren. Beide opvattingen vertoonen hun lacunes en moeilijkheden voor den lezer. Voor mij lijkt het groote verschil hierin te bestaan, en dit geldt voor de meeste theorien contra d' H é r e l l e, dat B o r d e t de eigenschappen, die een samenhang met het leven doen vermoeden, verklaart uit het leven der bacteriën, en d' H é r e l l e uit het leven van het virus.

Het resultaat van 't lezen van deze stukken is dan ook weer, dat geen beslissend standpunt kan worden ingenomen, doch

het van het subjectieve oordeel van den lezer afhangt, of hij zich ter eener of ter andere zijde zal scharen.

Wat betreft de oorspronkelijke caviaproef van Bordet en Ciuca, velen hebben hem herhaald (Prausnitz, Leitner, Kuttner, Pondman enz.) en met zeer wisselende uitkomsten. Een enkel experiment mag ik misschien even naar voren halen.

Sumiyoshi (66) gaat na, of tengevolge van het injecteeren van culturen in de buikholte, bacteriophag door de darmwand heen diffundeert. Hij komt tot positieve resultaten. Hij spuit in met een resistente stam en hij verkrijgt bacteriophagen, die deze stam ongemoeid laten, doch die hun werking uitoefenen op allerlei andere culturen. Met andere woorden:

De sterke prikkel van de injectie is aanleiding tot het doordringen van phaag in de buikholte en de bacteriecultuur is hiervoor van ondergeschikt belang.

Deze vondst stemt geheel overeen met de mededeeling van verschillende auteurs, dat, zoo er een phaag gevonden wordt, deze bacteriophag doorgaans eveneens in de darm aanwezig is.

Ter verklaring van de erfelijkheid van het lytisch principe houdt Bordet de volgende redeneering, naar zijn zeggen gestaaft door proeven, die hij echter niet beschrijft.

Stel een principe L is een eigenschap van de bacterie C. C zal dan door alle generaties heen, dit principe reproduceeren.

Eventueel zal dit principe door een soortgenoot geadopteerd kunnen worden en zich ook hier voortplanten. Dit zouden de lysogene, niet lysabele culturen zijn. Een soort vreemd principe P. daarentegen, zal, hoewel lyseerend werkend op de bacterie soort C, niet door deze gereproduceerd worden. Bij overenten zal dus dit principe verloren gaan. Proeven zouden deze stelling hebben bevestigd. Het verschijnsel is echter volgens Bordet in strijd met de virusnatuur. Immers is van beide principes P het krachtigste, daar P tot oplossing der cultuur leidt. P is dus het beste instaat te parasiteeren, of, met andere woorden, zich te vermenigvuldigen. In zijn proeven echter ging P verloren en vond hij L geregeld terug. d'Hérelle (37) heeft hierop geantwoord, dat het lysogeen zijn berust op een soort symbiose tusschen bacterie en bacteriophag, een soort chroni-

sche ziekte, die juist zeer wel te verklaren is uit het feit dat L het zwakkere principe is. In hetzelfde stuk gaat hij over tot een directe aanval op B o r d e t en vraagt dezen hoe of hij zich een heredititeit voorstelt, waar de continuïteit ontbreekt. Immers bij het aantoonen van de lysis worden steeds jonge „nieuwe” bacterien toegevoegd, terwijl de overgeënte lysaten „bacterievrij” zijn.

Deze aanval is blijkbaar nog gericht tegen de oorspronkelijke opvatting van B o r d e t. Op de wijziging hiervan past hij tenminste niet. B o r d e t doet dit in zijn antwoord dan ook blijken.

S e i f f e r t (63, 64, 65) is een dergenen, die het lytisch principe beschouwt als een katalysator. Hij motiveert deze gedachte met de uitkomst van een temperatuur onderzoek. Hierbij bleek hem, dat de phaag geïnactiveerd wordt bij 100° C., doch deze temperatuur overigens goed verdraagt, daar het principe zijn werking weer kan ontplooiën na reactivereen. Het verdragen van de kookkhitte acht hij onvereinigbaar met onze opvatting over fermenten en ultraviolette virussoorten. Toch is de bacteriophag oorzaak van een fermentatief proces, dus zegt hij, moet het een katalysator zijn, die normale stofwisselingsproducten tot lytische werking aanzet.

Hierbij mag ik misschien even opmerken, dat de reactivering door S e i f f e r t werd bereikt met een filtratie door Chamberlandkaarsen, die hij steriliseerde in de waterdamp. Nu heeft F l u (21) levende coccen aangetoond in een kaars, die gedurende twee uur bij 100° C. gesteriliseerd was. Dus wel een bewijs, dat de luchtkussens in de capillairen van de kaars de temperatuur zeer slecht overal doen doordringen en de mogelijkheid niet is uitgesloten, dat bacterien een zoodanige sterilisatie overleven. Hiermee verliest de theorie van S e i f f e r t, wat aangaat de katalysator, allen grond.

Een volgende reden, waarom hij in de bacteriophag een bacterieproduct ziet, is de groote specificiteit, ook in antigene eigenschappen. Bij zijn onderzoek isoleert hij constant twee verschillende principes uit één stam, zelfs na een herhaald isoleeren van deze stam door afenten van geïsoleerde koloniën van platen. Bleek de virustheorie juist, dan zou er hier dus sprake zijn van een dubbel infectie, in één geval zelfs van een driedubbele infectie, die regelmatig mee zou zijn overgeënt.

Neemt men de bacterieele oorsprong aan, dan zou dit verschijnsel eenvoudig te verklaren zijn, met een ontstaan uit de bacterie-eiwitten. Deze opvatting steunt hij met het volgende experiment.

Daar volgens hem de bacteriophag een tryptische werking vertoont, moet de stof van eiwitachtige natuur zijn. Kweekt hij dus bacterieën in een stikstofvrij milieu, dan zullen ze de phaag niet kunnen produceeren en ten tweede zullen deze culturen, alhoewel zelf niet tot produceeren in staat, zeer lysabel moeten zijn. Eén van zijn veronderstelling is n.l., dat de phaag eerst de eiwit-voorraad zou uitputten en daarna het lichaamseiwit aantasten, waardoor de lysis zou veroorzaakt worden. De proef heeft werkelijk de gewenschte uitkomst.

Bij een kritische beschouwing valt evenwel dadelijk op, dat hij niet consequent vasthoudt aan de katalysator-natuur en vooral rept hij niet over de herkomst van het principe.

G o s h (27, 28) houdt zich strenger aan zijn opvatting. Ook hij beschouwt de bacteriophag als een bacterieproduct en ziet er eveneens geen ferment in, doch een coferment. Dit coferment zou een sterke affiniteit vertoonen voor soortgelijk gebouwde celementen. Zich als een wig indringende tusschen de eiwit-moleculen, zou het de toegang mogelijk maken voor de autolytische fermenten. Deze doen hun plicht en bij het te gronde gaan van de cel, komen de hierin aanwezige cofermenten vrij. Hier dus wel een verklaring voor vermeerdering en herkomst. Op mij maakte het echter den indruk, van meer een schermen met woorden, dan een werkelijk nieuwe theorie.

Een van de oudste theoriën is wel die van B a i l (8, 9). Hij neemt aan, dat onder invloed van uitwendige omstandigheden de bacterielichamen in brokjes („Splitter”) zouden uiteenvallen. Hij kende aan zijn „Splitter” levenseigenschappen toe. Deze „Splitter”, ontstaan uit bacteriedeeltjes, zouden de opbouwende eigenschappen verloren hebben en dus bij binnendringen in een normale cel een evenwichtsverstoring geven naar den kant van de autolyse. De specificiteit van de bacteriophag verklaart hij door aan te nemen, dat de „Splitter” slechts affiniteit, heeft voor een absoluut gelijk gebouwd celonderdeel in de aangevallen cel.

Dit aannemend, kan men natuurlijk de verschillende eigenschappen verklaren.

Het belangrijke van deze theorie zie ik echter niet in deze verklaring, doch in de bewijsvoering van B a i l en zijn school. Hij veronderstelt namelijk, dat het afsplitsen van een „Splitter” niet hoeft te leiden tot het te gronde gaan van het individu. Integendeel, zeer vaak blijft het individu instand en is nu ongevoelig voor bacteriophagwerking veroorzaakt door soortgelijke „Splitter” (zie zijn opvatting hierboven). Dit zouden de resistente culturen zijn. Deze culturen zouden volgens B a i l dus „verliesmutaties” zijn. In een aantal proeven toont hij inderdaad aan met verliesmutaties te doen te hebben; zelfs gaat de mutatie zoo ver, dat de antigene eigenschappen veranderen.

Een opleving van deze gedachten vinden we terug bij B u r n e t (13). Deze werkt een onderwerp uit over de antigene structuur van bacteriën en doet dit ongeveer op de door B a i l aangegeven wijze. Hij komt tot gelijke uitkomsten en breidt zelfs de theorie nog uit, door een verklaring te geven van de wijze waarop nu een bacterie, resistent geworden voor de eene phaag, plotseling een groote gevoelheid kan hebben gekregen voor een andere.

H o d e r (41) wordt getroffen door een zekere overeenkomst in groei en eigenschappen van phaagresistente culturen en die van mutanten. Hierop voortbouwend kweekt hij een zeker aantal mutanten. Geen van deze stammen levert een bacteriophag. Wel treft hij er een aan, die in alle eigenschappen met een phaagresistente stam overeenkomt. Bovendien zijn verscheidene mutanten serologisch en cultureel gedifferentieerd van de cultuur van uitgang. Merkwaardig is hun gedrag tegenover bacteriophagen. Sommigen zijn resistent, andere meer of minder gevoelig geworden.

Hij acht daarmee aangetoond, dat phaagwerking en mutatie tot dezelfde resultaten voeren en dat het dus hoogstwaarschijnlijk dezelfde mechanismen zijn. Verschillende schadelijke agentieën, die tot mutatie voeren, zullen dan onder omstandigheden ook aanleiding kunnen geven tot het vormen van bacteriophag. Als aanhanger van B a i l, verklaart hij dit alles met de „Splitter” theorie.

H o d e r is hiermee de eerste, die bewust wijst op de verandering in groeiwijze, tengevolge van bacteriophagwerking, een verschijnsel dat in de literatuur van den laatsten tijd herhaaldelijk wordt vermeld. (H a d l e y, P l a n t u r e u x).

Nu volgen eenige vermeldingen uit de literatuur, die al dan niet het ontstaan van bacteriophagen uit bacteriën aantoonen met negatieve bewijsgronden. De meesten dezer onderzoekers maken ook nog geen onderscheid tusschen bacterie-vreemd en bacterie-eigen. Bacterie-eigen sluit volgens hen in het niet-leven.

Allereerst dan een experiment van M e u l i (51). Hij stelt vast, dat de lysin-concentratie een bepaalde eindtiter heeft, onafhankelijk van de beginconcentratie en de hoeveelheid gente bacteriën. Hij gelooft daarom niet, dat de phaag een autonoom organisme is. Immers, enten in een maximale lysin-concentratie geeft direct bacterieverval en toch blijft de titerhoogte gelijk. Voor verhooging van titer is dus groei noodig. Bovendien vindt hij het feit, dat de lysis pas optreedt bij een bepaalde concentratie, eveneens in strijd met de theorie van d' H é r e l l e.

H a j o s (31) gelooft niet aan het leven van de phaag op grond van de grootte van het partikeltje. Hij filtreert door de Haen-membranen, die eiwitmoleculen tegen houden. Daar hij leven gebonden acht aan eiwit, is dus het levend zijn van de phaag onwaarschijnlijk. Hiermee roert hij een nog steeds niet opgeloste kwestie aan, n.l. of de phaag eiwit zou bevatten of niet.

G i l d e m e i s t e r e n H e r z b e r g (25) experimenteren met een colistam (88). Door de temperatuur te verlagen tot 8.75° C. à 9° C., gelukt het om de stam dusdanig van het lytisch agens te bevrijden, dat deze ultra rein kan worden verklaard, althans volgens hen.

Wordt deze stam echter in een waterbad bij 37° C. gekweekt, na een genoegzame verdunning, dan treden reeds na 45 minuten de eerste bacteriophagen op.

Hieruit concluderen de schrijvers, dat het lysine een bacterieproduct moet zijn. Bovendien komen zij op grond van verdere proefnemingen tot de gevolgtrekking, dat het spontaan vormen van lysine in de eerste plaats afhankelijk is van

de temperatuur en dat de snelheid van ontwikkeling van de bacteriën een secundaire rol speelt.

Flu (22) herhaalt deze proeven, waarbij hij nauwkeurig de voorschriften van de schrijvers volgt.. Slechts de manier van aantoonen van de bacteriophag wijzigt hij en is zoo in staat in culturen, die bij 6° C. zijn voortgekweekt, de phag aan te toonen.

Hij bewijst dat het lysine bij 9° C. belangrijk verzwakt is en daarom op de manier van Gildemeister en Herzberg niet te voorschijn te brengen is.

Bovendien scheidden deze schrijvers de bacteriën van de bacteriophag door een verhitting bij 57.5° C. gedurende 40 minuten. Flu laat zien, dat verscheidene bacteriën dit procédé overleven. Hij zelf brengt dan ook de scheiding teweeg door middel van een filtratie door Chamberlandkaarsen L.3.

Prausnitz (56) is een van de weinige voorstanders van de theorie van d' H é r e l l e. In een kritische beschouwing van de verschillende verschijnselen en na eigen onderzoek schaart hij zich in de rijen der voorstanders van de levende natuur van het agens, bijzonder de nadruk leggende op de variabiliteit en het aanpassingsvermogen van de bacteriophag. Voorloopig wenscht hij het kweken van het agens uit phagvrije culturen te schuiven op een onvoldoende controle van de ultra reinheid van deze.

Een veel meer steekhoudend bewijs voor de autonomiteit van de bacteriophag levert Flu (23).

Hij beschrijft een serie proeven, genomen met een pest-coli shigaphag, die is geïsoleerd uit de grachten van Leiden. Uit deze mededeeling blijkt de autonomie van de phag zeer overtuigend en bovendien ook nog een sterk regeneratie vermogen. Beide eigenschappen zijn moeilijk te combineeren met een levenloosheid.

De bacterieele oorsprong wordt door de volgende eigenschap al zeer onwaarschijnlijk gemaakt. De bewuste pest-coli-shigaphag toch, behoudt zijn lytisch vermogen in dezelfde graad voor de drie stammen na vijftien tot twintig passages en wel onverschillig of deze passages verricht zijn met pest of coli bacillen. Bij verwarming tot 56° C. gedurende een uur verliest de bacteriophag zijn lytisch vermogen voor coli en shigaba-

cillen. Dit vermogen herwint hij weer door filtratie en verdere passage op „pest” bacillen. Dus door een proces, waarbij absoluut geen contact met coli of shiga bacillen plaats heeft.

Vreemd doet een publicatie van Wollman en Wollman (72) aan. Zij beschrijven een subtilis-stam, die met een slijmerige variatie groeit. Hierbij hebben zij nooit eenige lytische werking opgemerkt, tot zij, tot tweemaal toe, plotseling een bacteriophag zien optreden. De ultrareinheid controleeren ze door een pasteurisatie van 5 min. bij 100° C. en een van 15 min. bij 85° C. Hierna is het phenomeen niet meer te reproduceeren geweest. Ik haal deze publicatie aan, om de vermelding van een afwijkende groei van de culturen die een bacteriophag hebben geleverd, een feit dat herhaaldelijk beschreven wordt.

In deze reeks passen nog twee publicaties, een van Bechhold (12) en een van Schuurman (68). Bechhold komt tot de gevolgtrekking, dat de vraag: ferment of levend wezen? niet te beantwoorden is en dat deze veranderd moet worden in bacterie-eigen of bacterie-vreemd. Het „lets” dat tot de lysis aanleiding geeft, neemt een plaats in tusschen leven en dood. Schuurman komt tot dezelfde gevolgtrekking. De colloïden hebben reeds vele eigenschappen die vroeger als integreerend voor het leven golden, in hun domein getrokken. Wellicht, aldus Schuurman, bestaat er geen scherpe grens. Filosofisch misschien alles zeer juist, doch voor de onderzoeker die op feiten wil steunen een lastig standpunt.

Thans wil ik de publicaties bespreken, die handelen over het verkrijgen van bacteriophagen uit verouderde culturen. Een van de eerste mededeelingen is wel die van Weinberg en Aznar (70). Uit een dertig dagen oude Shigacultuur hebben ze een phaag geïsoleerd. Veel meer dan een vermelden van het feit is het niet, daar controle op de gebruikte stammen vrijwel ontbreekt. Anders is het met publicaties van Otto, Munter, Winckler, Bail e.a. Doch ook voor hun mededeelingen is de ultrareinheid der stammen het strijdpunt.

Pondman (60) herhaalde de proeven van Weinberg. De resultaten waren negatief. Eveneens de resultaten van een herhaling van de experimenten van Gildemeister en Bail, en Otto, Munter en Winckler.

In twee gevallen zag hij een positief resultaat. In het eerste

geval verkreeg hij de bacteriophag uit een 22 dagen oude bouillon cultuur van een dysenterie Y (Y. 14), welke 21 dagen met pyocyaneus was geïnfecteerd geweest, terwijl in het tweede geval weer stam Y 14 in een 8 dagen oude bouillon-cultuur na 3 dagen contact met methyleenblauw een phaag deed ontstaan (proef volgens B o t e z).

Het is P o n d m a n reeds opgevallen, dat het in beide gevallen dezelfde stam is geweest, die phaag heeft geproduceerd.

Beschouwen we nu een onderzoek van F l u, over het ontstaan van bacteriophagen in oude culturen, als een aanvulling hierop, dan zien we bij dit onderzoek, dat weer slechts deze Y 14 de phaag produceert, dat deze stam door overenten te reinigen is, dat de phaag in zeer jonge culturen reeds aanwezig is en hierin kan worden aangetoond.

Deze bevindingen duiden toch wel sterk in de richting, dat de stam reeds bij de isolatie, besmet was en er blijkt uit dat het agens van agar buisje op agar buisje mee is overgeënt.

K u t t n e r (43) publiceert een stuk, waarin hij verklaart resultaten te hebben verkregen met weefselextracten van lever en darm van caviae en normaal konijnenserum. Bovendien gelukt het hem eveneens uit oude culturen een lytisch principe te isoleeren. Hij geeft echter zelf toe, dat een contaminatie niet is uitgesloten, zoodat zijn proeven eigenlijk bewijskracht missen.

O g a t a (55) gelukt het in een groote serie experimenten bacteriophagen te winnen uit oude culturen. De jonge cultuur gaf nooit lysis en heeft ook daarna nooit het verschijnsel vertoond. Hij paste de volgende techniek toe. De te onderzoeken culturen werden in bouillon geënt. Deze bouillon liet hij indrogen tot er een stroopdikke massa op den bodem van het buisje achterbleef. Tusschentijds werd geregeld uit de bouillon geënt en deze vloeistof op phaag onderzocht. Al deze controles bleven negatief. Pas toen de cultuur gestorven bleek te zijn, trad in de stroop een lytisch principe op, dat aan de eischen van d' H é r e l l e voldeed. Een eigenaardigheid is, dat uit de phaag-resistente stammen, die in de serie waren ingevoegd, geen phagen konden worden gewonnen.

M a l l m a n (49), gedreven door de vele positieve vondsten, onderzocht een groot aantal pathogene en niet pathogene labo-

ratoriumstammen. Hij liet ze verouderen en trachtte op verschillende tijdstippen een lytisch principe aan te toonen. Hij heeft geen resultaten mogen boeken.

De nu volgende publicaties bevatten nog verscheidene vermeldingen van het doen verouderen van de culturen, doch is het essentieele nu niet meer dit verouderen, doch de abnormale omstandigheden, waaronder de bacteriën groeien.

Door het brengen van de culturen onder bijzondere omstandigheden denkt F u k u d a (24) hen tot bacteriophagvorming te kunnen prikkelen. Hij kiest hiervoor een „overbevolking” van zijn media. Hij is op deze gedachte gekomen door de vermeldingen, dat bacteriophagen in oude culturen zouden zijn gevormd en veronderstelt dus, dat in deze culturen een overbevolking zou ontstaan.

Dit moet zoo opgevat worden, dat F u k u d a de cultuur denkt in het stadium van het maximum aantal (M. Konzentration), dat zich een tamelijken tijd kan handhaven.

De toegepaste techniek is aardig gevonden en schakelt prikkelingen door stofwisselings producten zoo veel mogelijk uit. Hij entte n.l. in 5 cc bouillon. Na voldoende groei werd gecentrifugeerd. De heldere vloeistof werd afgeschonken en vervangen door 4 cc versche bouillon, waarin een lus jonge cultuur werd geënt. Hierdoor werd dus een hoeveelheid van 5 cc gebracht op 4 cc. Bovendien zou de jonge cultuur zich vermenvuldigen en het aantal individuen nog doen vermeerderen.

Daarna bracht hij het volume op 3 cc en entte weer jonge cultuur in deze bouillon. Deze bewerking herhaalde hij nog eens en ging dan over tot het onderzoek op bacteriophag.

Zijn theoretische veronderstellingen heeft hij niet gecontroleerd, daar hierdoor de infectiekansen te zeer zouden stijgen.

De controle op verontreinigingen is zeer streng en conscientieus doorgevoerd.

Hij komt met 3 stammen (dysenterie Y, paratyphus B, C o l i) tot positieve resultaten. Er ontstaan zeer kleine plagues, de gevormde phaag is weinig resistent en gaat spoedig weer te gronde. Slechts een zeer zorgvuldige behandeling en voortkweeking versterkt het gevonden principe en dan is pas de overentbare lysis er mee aan te toonen.

De proeven met andere bacteriesoorten (Shiga, Typhus) vielen negatief uit.

Als bijzonderheid vermeldt hij nog, dat steeds een zeer specifieke phaag gevormd werd.

De vorming van de bacteriophaat is steeds aanleiding tot het vormen van mutanten en deze stammen zijn „phagfest”. Hierdoor wordt de spontane verdere ontwikkeling der bacteriophagen zeer bemoeilijkt. Het optreden van de bacteriophaat maakte niet de indruk van een vermeerdering uit enkele kiemen, doch meer van een vorming „en masse”. De pas gevormde phagen waren zeer gevoelig voor verwarming en stierven reeds bij een verhitting tot 56° C. Deze eigenschap veranderde bij het verder kweken, behalve voor de coli-phaat, die de gevoeligheid tot de 15e passage behield.

„De mutanten vertoonden in bouillon een eigenaardige groeiwijze” (Bodensatz), die eveneens was opgetreden bij een mutant die eenige jaren voor deze proefnemingen uit de cultuur was ontstaan.

Schrijver komt tot de conclusie, dat bacteriophaat uit bacteriophaatvrije cultuur kan gevormd worden en dat dit zelfs vrij regelmatig het geval zal zijn. Het meerendeel dezer phagen gaat echter te gronde. Het aanwezig geweest zijn vindt dikwijls zijn uitdrukking in het ontstaan van mutanten.

Leitner (48) herhaalt nog eens de verschillende proefnemingen die tot positieve resultaten hebben geleid. Achtereenvolgens passeeren de experimenten van Bordet en Ciuca, Lisbonne, Boulet, Carrère en Borchhardt de revue, die de phaag doen ontstaan door de inwerking van leucocyten, darm secreten enz. op bacteriën; daarna volgen proeven over bacterieel antagonisme, autolyse, verouderen, toevoegen van agendiën enz. Geen dezer experimenten levert iets op. Slechts de experimenten, opgezet volgens de gegevens van Otto en Munter, doen een phaag verschijnen.

Hij twijfelt echter aan de reinheid van de stammen. Een serie experimenten in deze richting genomen, maakt inderdaad zeer aannemelijk, dat de stammen geen ultra-reine culturen zijn, doch dat zij de phaag reeds van te voren herbergden.

Hij eindigt met de stelling, dat, met de tot nu toe gevolgde

methode, men geen phagen kan „verwekken”, wel eventueel latent aanwezige, manifest doen worden.

R o s e n t h a l (62) heeft gezocht naar een methode, waarmee hij de overentbare lysis kon doen ontstaan in reine bacteriestammen, zonder dat er, op welk oogenblik dan ook, een factor op de culturen zou inwerken, die vreemd was aan de bacteriën. Hij denkt deze te hebben gevonden in den invloed van het filter. Hij maakt gebruik van de filterkaarsen van Chamberland L.5, die zoowel binnen als buiten door bouillon worden omgeven. Beide vloeistoffen worden geënt met cultuur. Hij verricht nu een serie passages door van de omringende bouillon te enten „in” de nieuwe kaars en deze te dompelen in bouillon geënt met een jonge cultuur. Een nauwkeurige beschrijving van de techniek zal ik in het volgende hoofdstuk geven, waarin ik de herhaling van zijn proeven beschrijf.

Met deze wijze van kweken slaagt hij erin, bij een zeer groot aantal stammen, waarvan verscheidene niet met elkaar verwant zijn, het overentbare lytische principe te verwekken. Hieruit trekt hij de conclusie, dat het principe deel uitmaakt van een „constante” phase van de ontwikkeling der bacteriën.

P l a n t u r e u x (57, 58, 59) tracht de milieu-verandering te verkrijgen door de toevoeging van verschillende zouten. In zijn eerste publicatie kweekt hij de bacterie in een alkalisch milieu. In bouillonbuisjes druppelt hij stijgende hoeveelheden Natronloog en ent in deze vloeistoffen twee stammen uit zijn laboratorium. Het geheel komt nu in de stoof bij 37° C. Elke zes à zeven dagen worden eenige druppels uit deze culturen gestreken over agarbuisjes. Op een goed oogenblik ziet hij de groeiwijze van de bacteriën veranderen. In plaats van ronde gladde, glanzende kolonien verschijnen kolonien met een gekorrelde oppervlak en een gerafelde rand. Hij vergelijkt ze met miltvuur koloniën. De meest gedifferentieerde kolonie wordt in bouillon overgebracht, twintig dagen bij 37° bewaard, gefiltreerd en het filtraat onderzocht op bacteriophagvorming tegenover de oorspronkelijke stam. Zeer vaak is het filtraat reeds dadelijk in staat een oplossing teweeg te brengen. Versterken door passages doet de werkzaamheid aanzienlijk toenemen.

d' H é r e l l e (40) oefent hierop kritiek uit en constateert

dat alle groei onmogelijk is bij de graad van alcaliciteit door Plantureux in zijn milieu gebruikt. Bovendien heeft hij gevonden, dat een kweken bij de alcaliciteit, waarbij nog net groei mogelijk is, de bacteriophag uit experimenteel besmette culturen doet verdwijnen, dus wel juist het tegenovergestelde van de bevindingen van Plantureux. Hieraan kan ik toevoegen, dat ook Flu in het laboratorium te Leiden in de bouillon volgens opgaven van Plantureux, de meeste culturen heeft zien te gronde gaan.

In een der volgende publicaties van Plantureux (50) tracht deze hiervoor een verklaring te geven, door te vermelden, dat de loogoplossing reeds zeer lang had gestaan en dus vermoedelijk was overgegaan in een carbonaatvorming.

Dit zelfde stuk handelt over een soortgelijk onderzoek, uitgevoerd met calciumchloride. De resultaten zijn hetzelfde.

Hij geeft nu tevens een theoretische verklaring aan het verschijnsel en bovendien zijn denkbeelden over de bacteriophagie.

„De bacteriophag is een colloïd van bacterieelen oorsprong”. Een steun voor de colloïdale natuur ziet hij voornamelijk in de snelle wijze van binding aan de bacteriën. Dat de phaag van bacterieelen oorsprong is valt op te maken uit de experimenten.

Hij beschouwt een colloïd, als te bestaan uit een onveranderlijke kern en een „perigranulaire laag”. Het electrisch teeken van deze laag kan willekeurig veranderd worden. Deze laag neemt het teeken aan van het electrolyt dat tot de vorming van het colloïd aanleiding is geweest.

Daarom juist kan hij door de meerwaardige atomen van de verschillende zouten de vorming van bacteriophagen (lees colloïden) provoceeren. Deze colloïden (bacteriophagen) krijgen dan een teeken tegengesteld aan de bacteriën.

De specificiteit van de phaag vindt zijn grond in het onveranderlijke granulum.

De techniek, bij deze experimenten gevolgd, zal ik uitvoeriger bespreken bij de herhaling van zijn proeven.

Hij neemt aan dat de colloïden zich in een bepaalde verhouding tegenover elkaar bevinden, een soort evenwichtstoestand. Bindt zich nu een phaag aan de cel, dan is het evenwicht

verstoord. De cel reproduceert bij zijn groei de verschillende colloïden, ook het binnen gedrongen colloïd. Hierdoor ontstaat een nog grooter wanverhouding, waardoor de cel te gronde gaat en aan de lysis ten prooi valt.

Bovendien verklaart hij in een volgende mededeeling de bacteriophagen identiek met de antilichamen en hierop door-theoretiseerend zegt hij, dat de antistoffen dus geen product zijn van het met antigeen behandelde individu, doch afkomstig zijn van de geïnjiceerde bacterie. Een opvatting in flagranten strijd met de bevindingen. Immers staat de hoeveelheid antilichamen in geenendeele in een quantitative verhouding ten opzichte van het geïnjiceerde antigeen.

Zich niet uitlatend over de theoretische kwestie, heeft A n c i a u x (1) de proeven van P l a n t u r e u x, wat betreft die met calciumchloride, herhaald. Hij heeft tot in de kleinste onderdeelen dezelfde techniek gevolgd, doch kon geen positieve resultaten melden. Zijn conclusie is voorzichtig gesteld. „Niet met zekerheid kan men bacteriophagen uit bacteriën verkrijgen, die in een calcium-chloride houdend milieu zijn gekweekt”.

Reeds in 1924 beschrijft H a d l e y (32) een experiment, waarin hij het heeft over een soort dissociatie van een pyoceaneusstam, in een lytische en lysogene L.variatie en in een niet lytische R.variatie. Deze letters kunnen verwarring stichten, daar de R.variatie in zijn beschrijving zou overeenkomen met de S.culturen uit zijn latere publicatie en de L.variatie met de R.vormen hieruit.

Filtraten van beide variaties vertoonen lytische werking, de L.variatie de sterkste. Uit zijn onderzoeken besluit hij, dat deze werking overeenkomt met de bacteriophagie. Verder verklaart hij te moeten opmaken uit zijn bevindingen, dat de lyseerende stof een celbestanddeel moet zijn, dat tot werking wordt aangezet door een nog onbekende factor uit de omgeving. Dus een tamelijk ongedefiniëerde theorie, die eenige overeenkomst vertoont met die van S e i f f e r t, G o s h e a.

Ook in een volgende publicatie, samen met K l i m e r (33), praat hij nog van bacteriophagen die zich uit bacteriën ontwikkelen door een invloed uitgaande van de omgeving. In dit stuk heeft hij lysin-productie verkregen door de inwerking

van pancreasextract, peptonoplossing, gedistilleerd water en zelfs zonder bijvoeging van een of andere stof. Dit laatste echter pas na vele passages en met een zeer ingewikkelde techniek.

In denzelfden tijd ongeveer is hij zijn werk over bacterie-dissociatie (34) begonnen en nu wijzigt zich zijn inzicht belangrijk. Hij wil nu de bacteriophag houden voor een filtreerbare vorm van de bacterie, die regelmatig zou moeten ontstaan in de bacterie-cyclogenie. Hier haalt hij ook het werk van E n d e r l e i n aan. Zelf geeft hij echter dadelijk toe, dat dit alles hypothesen zijn, die nog een uitgebreid onderzoek vereischen. Diep ben ik hier niet op ingegaan. Ten eerste is dit werk zeer moeilijk te comprimeeren en ten tweede zijn het voornamelijk theoretische bespiegelingen.

Veel meer positief is hij in zijn laatste publicatie (35, 36). Hierin spreekt hij zich uit, dat de bacteriedissociatie hoogstwaarschijnlijk samengaat met een bacteriophag-productie. De R.vormen in de bacterieculturen zijn de dragers van het principe. Kan men dus een S.vorm doen overgaan in een R, dan zal men in staat moeten zijn hierin bacteriophag aan te toonen. De phag is dus een zuiver bacterieproduct.

Zijn proeven bevestigen deze meening; ik zal er in het volgende hoofdstuk op terug komen.

Bij de bespreking in deze publicatie haalt H a d l e y verschillende onderzoekers aan. Hun conclusies kan hij niet onderschrijven, doch hun experimenten kan hij zeer wel met zijn eigen theorie in overeenstemming brengen.

Inderdaad spreken al deze onderzoekers van culturen, die onder invloed van de verschillende bewerkingen, veranderen van aspect. Ze vormen koloniën, die, vergeleken met die van den uitgangsstam, vlakker en doffer zijn, een meer korrelig oppervlak hebben, geagglutineerd groeien enz. Allemaal kenmerken van de R.koloniën van H a d l e y.

Voor mij had deze verklaring en zienswijze een groote aantrekkelijkheid, daar nu al de hypothesen en bevindingen zouden kunnen worden verklaard vanuit één gezichtspunt.

Rest mij nog de besprekingen van de publicaties van d e n D o o r e n d e J o n g (18, 19). Dit zijn eigenlijk de eenige publicaties, die, alhoewel niet zonder kritiek gebleven, toch feiten

brengen, die door elken onderzoeker kunnen worden gereproduceerd.

Hij vangt aan met een beschrijving te geven van de bacillus megatherium en vindt hierbij gelegenheid, attent te maken op het zeer eigenaardige gedrag van de secundaire koloniën van deze bacil. Aanvankelijk boven het oppervlak van de primaire cultuur groeiend, worden ze doorschijnend en zakken in deze cultuur weg. Het eindresultaat is een helder, verdiept putje. Bovendien bleken deze heldere koloniën uit een asporogeen mutilaat te bestaan. Hij geeft een methode aan, waarop men deze mutilaten in reïncultuur kan winnen en bespreekt de verschillende eigenschappen van deze culturen.

De merkwaardigste is wel, dat na ± 14 dagen de cultuur doorzichtig wordt en afsterft.

Hij brengt dit in verband met het phenomeen van d' Hérelle, doch slaagt er niet in, een lytisch principe aan te toonen. Anders wordt dit, als blijkt dat het mutilaat van stam 899 met „Flattervormen” groeit. Uit deze stam (899) laat zich een lytisch agens afzonderen, dat bij verder onderzoek alle eigenschappen van de bacteriophage toont te bezitten. Dit agens blijkt eveneens actief voor andere mutilanten van de bacillus megatherium.

Het werkzame filtraat is verkregen van een cultuur, die gegroeid was uit een spore, die zorgvuldig vijf minuten bij 100° C. was verhit. Den Dooren de Jong stelt zich voor hierdoor de bacteriophage, die eventueel in de spore aanwezig had kunnen zijn, te hebben gedood.

Hij bewijst dus hiermee, dat de bacteriophage een product van de bacterie is.

In een volgende mededeeling werkt hij zijn proeven nog verder uit en vindt hierbij, dat de vorming van plagues afhankelijk is van twee factoren; ten eerste van de gevoeligheid van het mutilaat en ten tweede van de selectiviteit van het filtraat. Eischen die algemeen bekend zijn en die de grondslag vormen van het werken met bacteriophagen.

Daarom zegt hij, mag men uit het niet vinden van plagues niet concludeeren, dat de phage er niet is, doch slechts, dat de voorwaarden om zich te manifesteren niet vervuld zijn.

Hij is overtuigd, dat elke megatherium een bacteriophag vormt.

Cowles (16) levert kritiek op deze conclusies en wel met een indirect bewijs.

Hij veronderstelt, evenals ik dat bij mijn proeven heb gedaan, dat de spore de bacteriophag zou kunnen beschermen tegen de hooge temperatuur. Om dit aan te toonen is hij als volgt te werk gegaan.

Culturen van anthrax en subtilis, die van te voren nooit eenige lytische vermogens hadden vertoond, heeft hij met bacteriophagen samen gekweekt. Deze culturen vormden secundaire koloniën, die bleken te bestaan uit bacteriophag-resistente individuen. Na een verhitting van deze kolonie tot 80°, 90° en 100° C. gedurende verscheidende minuten, kon hij steeds in de, uit de sporen ontkiemende, koloniën een bacteriophag aantoonen.

In zijn conclusie is hij zeer voorzichtig. Hij zegt toch, dat deze proeven niet bewijzen, dat het lytisch agens als zoodanig de verhitting heeft overleefd, doch slechts dat het terugwinnen van een lytisch principe uit een gepasteuriseerde cultuur geen absoluut bewijs is voor het spontane vormen van de bacteriophag in die cultuur.

In een van zijn vorige publicaties (15) past Cowles trouwens nog de pasteurisatie toe om zijn stam, toevallig een megatherium, van aanhangende bacteriophag te bevrijden. De resultaten genoemd in deze publicatie en in de vorige pleiten er mijn inziens voor, dat de phag niet nieuw gevormd is, doch slechts de verhitting heeft overleefd, beschermd door de spore.

EIGEN ONDERZOEKINGEN

Uit de vele onderzoeken heb ik een greep moeten doen in de hoop, dat de resultaten mij zouden in staat stellen een antwoord te geven op de vraag, die de titel van dit proefschrift vormt.

Bijzonder aantrekkelijk was voor mij de opvatting van *H a d l e y* (36), die, zoo zij juist bleek te zijn, veel tegenstrijdigs zou kunnen oplossen en tevens verklaren, waarom al de onderzoekers langs zoo zeer verschillende wegen tot gelijke resultaten zijn gekomen. Als vanzelf pasten zich de onderzoeken van *P l a n t u r e u x* (58, 59) hierbij aan.

De experimenten van *R o s e n t h a l* (62) hebben mij tot herhalen verlokt, door de buitengewone gemakkelijheid, waarmee hij bacteriën tot phaag-productie brengt. Waren deze onderzoeken juist gebleken, dan waren zij voor onze laboratoria van onschatbare waarde geweest.

De 4e groep experimenten tracht het werk van *d e n D o o r e n d e J o n g* (18) aan te vallen. Deze onloochenbare feiten moeten iedere aanhanger van de virustheorie tot strijd prikkelen.

PROEF I. (VOLGENS ROSENTHAL)

Bij de oorspronkelijke proeven van *R o s e n t h a l* zijn door hem zulke fraaie resultaten bereikt en met een dergelijke regemaat, dat hij tot de conclusie komt, dat het lysine een deel moet uitmaken van een ontwikkelingsphase van de bacterie. Tot mijn spijt heb ik zijn vondsten niet kunnen bevestigen.

Laat ik beginnen met de techniek te beschrijven, die ik heb toegepast.

Gebruikt werden de korte Chamberlandkaarsen (7.5 c.M.) L.5 in de normale glazen hulzen. De kaars werd op de gewone

wijze in de huls gedaan en zelf eveneens met een watteprop gesloten, het geheel werd gesteriliseerd.

Nu werden zoowel kaars, als huls met bouillon gevuld. De kaars moet flink in de vloeistof zijn ondergedompeld. De bouillon in en om de kaars werd geïnfecteerd met bacteriën van dezelfde jonge cultuur (± 12 uur oud), eveneens een buisje bouillon ter contrôle.

't Geheel kwam 48 uur bij 37° C. te staan, waarna een volgende serie werd ingezet, met dit verschil, dat de bouillon in de kaars geïnfecteerd werd met de vloeistof uit de huls van de eerste serie, en de zich in de nieuwe huls bevindende bouillon met de jonge cultuur.

De rest van de vloeistof uit de huls van de eerste serie werd onderzocht op de aanwezigheid van bacteriophag.

Op deze wijze werd voortgegaan tot 25 series waren onderzocht.

De aanwezigheid van het lysine werd nagegaan door de vloeistof uit de huls te filteren door Chamberlandkaars L.3 en met dit filtraat een suspensie van bacteriën in bouillon te infecteren. Van deze geïnfecteerde suspensie werd bovendien uitgestreken op schuine agar (1½%) om eventuele vorming van plagues te kunnen aantonen.

Als cultuur milieu heb ik bouillon gebruikt, die bereid was volgens het recept van P. Rosenthal en wel: aqua dest. 1000, peptone pancreatique de porc de Defresne Vaillant (très dégradée) 20; het geheel gebracht op een pH van 7.8.

Rosenthal voegt bij de staphylococcon culturen hieraan nog 2 gram NaCl toe en voor gonococcon bovendien nog eenige cc extract globulaire. Ik heb deze beide bacteriesoorten niet gebruikt.

Tot het getal 25 ben ik gekomen, doordat Rosenthal dit noemt als het aantal overentingen waarbij het hem gelukt is de meest resistente cultuur tot lysine-productie te brengen (staphylococcon).

Hij is tot resultaten gekomen met bac. typhosus, paratyphosus, coli, dysenterie, enterococcus, bac. pneumoniae I, II, III, pyoceaneus, bac. v. Friedlander, gonococcon en staphylococcon.

Ik gebruikte voor mijn proeven: één typhusstam, één paratyphus B, één cholera, één pyoceaneus, één prodigiosus, één Flexnerstam.

De resultaten zijn negatief geweest.

Door deze uitkomst gedreven heb ik willen nagaan of misschien de mogelijkheid bestond, dat Rosenthal gewerkt had met lysogene stammen, die het verschijnsel slecht reproduceerden. Hij noemt n.l. als onderzoek op het lysogeen-zijn slechts een herhaalde passage over platen en afenten van de normale ronde koloniën, in principe dus een onvoldoende onderzoek.

Voor deze proeven heb ik gebruik gemaakt van de stammen Ch. 101, Y 14 en Shiga—Gildemeister. Deze stammen zijn bij een vorig onderzoek lysogeen gebleken. Pas na een zeer ingrijpende behandeling en slechts in hun werking op andere stammen kwam de contaminatie met bacteriophag tot uiting.

Hiermee heb ik twee series proeven opgezet. De eerste serie geheel volgens voorgaande techniek. De tweede serie heb ik zoo gewijzigd, dat ik niet uit de huls de kaars van de volgende reeks besmette, doch van kaars in kaars entte, en in de huls steeds jonge cultuur bracht van resp. Cholera 96, Shiga 15 en Y 31; alle zeer lysabele stammen.

Ik ging hierbij uit van de gedachte, dat het lysine in de kaars zou worden gevormd en naar de vloeistof in de huls zou diffundeeren, waar het in de jonge cultuur een gelegenheid zou vinden zich te vermeerderen en zich te manifesteren.

Bij beide reeksen heb ik acht passages verricht. Resultaten in dien zin dat een bacteriophag door den wand van het filter in de omringende bouilloncultuur getreden was, hebben ze niet opgeleverd.

Ik moet dus tot de conclusie komen, dat deze methode de bacterien niet tot lysine vorming kan aanzetten en evenmin in staat is uit lysogene stammen de bacteriophag vrij te maken.

PROEF II. (VOLGENS HADLEY)

Hadley beschrijft allereerst een serie culturen, die hij tot dissociatie brengt, door ze te kweken in homoloog immuun serum. Twee konijnen werden met een typhusstam geïmmuni-

seerd en het serum hiervan werd gemengd met bouillon. In dit medium werd nu de oorspronkelijke stam gekweekt. Voordien had deze stam nooit eenige teekenen van lysis vertoond en was slechts gegroeid met S.koloniën.

Na eenige overentingen begon de eerst homogene groei over te gaan in een geagglutineerde. Na de zesde overenting verschenen op de platen slechts R.vormen.

Geen dezer koloniën vertoonde in bouillon, noch op agar, ook maar eenige lytische verschijnselen.

Een van deze R-koloniën, werd geënt in 30 cc bouillon (pH. 7.8) en een nacht bebroed bij 37° C. Daarna werd de bouillon gefiltreerd en dit filtraat nagegaan op lytisch vermogen ten opzichte van de S-vorm. De uitkomst was negatief en het procédé werd herhaald. Reeds het derde filtraat gaf aanleiding tot de vorming van talrijke plagues en hieruit liet zich een actief lytisch agens opbouwen.

Om de tegenwerping te ontgaan, dat misschien het konijnenbloed bacteriophag had bevat, zette hij een tweede reeks proeven in, die op een geheel andere wijze tot dezelfde resultaten leidden.

De typhusstam van de vorige experimenten werd weer in 30 cc bouillon geënt en één nacht bebroed. Hierna werd niet verder met de cultuur gemanipuleerd, en deze werd in het donker weggezet gedurende verscheidene maanden (12 Juli—23 October).

Toen na verloop van dezen tijd de bouillon op platen werd uitgestreken, verschenen niets dan R-koloniën. In tegenstelling met de vorige groeiden deze in bouillon met een egale troebeling inplaats van geagglutineerd. Geen teekenen van lysis waren te zien. Het filtraat van deze bouillon, onderzocht op bacteriophag tegenover de S-vorm, vertoonde een menigte plagues, en ook hieruit kon een zeer actieve bacteriophag gekweekt worden.

Om de mogelijkheid uit te sluiten, dat reeds de oorspronkelijke cultuur bacteriophag bevatte, werd vanuit het buisje, dat eenige maanden gestaan had, één cc vermengd met 30 cc versche bouillon. Dit mengsel werd gefiltreerd en dit filtraat werd op phag onderzocht. De uitkomst was negatief.

Deze tweede serie proeven is herhaald. Prof. Flu was zoo

vriendelijk de R-koloniën te kweeken, die ik daarna heb onderzocht. Hier volgt het protocol.

11 Februari 1931 werden fleschjes, die 30 cc bouillon bevatten, geënt met de volgende stammen:

Shiga: 17, 18, 121, 122, 123, 124, 125.

Flexner: 38, 39, 141, 142, 143, 144.

Typhus: 120, 77, 78, 75, 76.

P. T. A.: 80, 81, 82, 83, 84.

P. T. B.: 86, 87, 88, 89, 90.

Cholera: 40, 129, 130, 131, 132, 133.

Deze fleschjes kwamen 24 uur bij 37° C. te staan. Daarna werden ze in een donkere kast bewaard.

1 Mei 1931 werden van de volgende stammen verdunningen uitgestreken op agarplaten:

Siga: 17, 121, 122, 123, 124.

Flexner: 38, 39, 141, 142, 143, 144.

Cholera: 40, 129, 131, 132, 133.

P.T.A.: 80, 81, 82, 83, 84.

Met het resultaat:

Shiga	17	steriel.
"	121	6 R kolonien, 17 S.R.
"	124	groot aantal S en S.R.
"	123	groot aantal S.R.
"	122	10 R., rest $\pm$ 100 S.R.
Flexner	38	uitsluitend R.
"	39	uitsluitend R.
"	141	zeer veel S.R.
"	142	S.R., enkele R.
"	143	uitsluitend R.
"	144	S. en S.R.
Cholera	131	geïnfecteerd.
"	132	geïnfecteerd.
"	133	uitsluitend S.
"	40	steriel.
"	129	steriel.

P.T.A.	80	uitsluitend S en S.R.
"	81	uitsluitend S.R.
"	82	zeer veel S.R.
"	83	uitsluitend R.
"	84	S. en S.R.

7 Mei 1931 werden de overige culturen nagegaan op de vorming van R-koloniën.

Typhus	120	uitsluitend S.
"	77	overgang van S—S.R.
"	78	uitsluitend S.
"	75	S en S.R.
"	76	S en S.R.
P.T.B.	86	beginnende S.R. vorming.
"	87	beginnende S.R. vorming.
"	88	beginnende S.R. vorming.
"	89	alleen S.
"	90	steriel.

De navolgende R-kolonien werden in bouillon geënt:

Shiga	121	a.
"	122	b.

Flexner	39	c.	(met deze letters zijn de koloniën in de
"	38	d.	tabel aangegeven).

Flexner 142 e en f.

P.T.A. 83 g.

Ze werden nu gedurende eenige dagen bij 37° bebroed, de bouillon werd gefiltreerd en het filtraat onderzocht op bacteriophag door het in bouillon te enten en het uit te strijken op 1½% agar gemengd met respectievelijk een zeer lysabele Shiga, Flexner en P.T.A.

Indien het resultaat negatief was, werd het bouillonbuisje

gefiltreerd door Chamberland L.3, het filtraat opnieuw in bouillon geënt met dezelfde stammen en eveneens weer op 1½ % agar uitgestreken.

Dit procédé werd herhaald tot vijf passages hadden plaats gehad. Het getal vijf is willekeurig gekozen. Hadley had reeds na drie passages succes bij de serumreeks en reeds na de eerste passage bij de oude culturen. Vijf passages leek mij daarom een voldoende contrôle.

Uit de tabel blijkt, dat de cultuur van kolonie e bij de 5e passage een verheldering van de bouillon vertoonde en dat op de agar eenige plages waren ontstaan.

Door successievelijk filtreeren en enten heb ik dit agens kunnen kweken tot een krachtige bacteriophag.

TABEL I

	a	b	c	d	e	f	g	contrôle
Geënt op agar.	+	+	+	+	+	+	+	+
in bouillon	+	+	+	+	+	+	+	+
1.	O	O	O	O	O	O	O	
agar.	+	+	+	+	+	+	+	+
bouillon.	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	O	O	O	O	O	O	O	
agar.	+	+	+	+	+	+	+	+
bouillon.	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	O	O	O	O	O	O	O	
agar.	+	+	+	+	+	+	+	+
bouillon.	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	O	O	O	O	O	O	O	
agar.	+	+	+	+	+	pl	+	+
bouillon.	+	+	+	+	+	—	+	+
5.	O	O	O	O	O	O	O	

+

O = gefiltreerd na 24 uur bij 37° C.

— = helder.

pl = plages.

PROEF III. (VOLGENS HADLEY)

In een volgende publicatie beschrijft Hadley een nieuw experiment over de filtrabiliteit van bacteriën. Ook hier komt de dissociatie aan te pas en die verkrijgt hij hier door kweken met lithium-chloride, pancreatine en wederom door het laten verouderen.

Daar Prof. Flu deze experimenten wilde herhalen was dit een welkome gelegenheid om op andere wijze verkregen R-koloniën op bacteriophag te onderzoeken.

In bouillonbuisjes, die 0.25 % lithiumchloride bevatten, werd geënt. Deze buisjes werden 24 uur bebroed. Van deze bouillon werd uitgestreken op platen; hiervan weer opnieuw in lithium-chloride-bouillon geënt ect., tot de omslag van S in R had plaats gehad. Dit gebeurde gewoonlijk bij ongeveer de zesde overenting.

Ik kreeg van de volgende stammen R-koloniën, die op deze wijze waren ontstaan: Shiga 17, 18, 20, 21, 22, 127. Hiervan entte ik in bouillon: 1 kolonie van 17, 2 koloniën van 18 en 1 kolonie van 20, 21, 22, 127.

Na ongeveer drie weken in de stoof te hebben gestaan werd de bouillon gefiltreerd. Het filtraat werd op dezelfde wijze als bij de vorige serie onderzocht op bacteriophag, weer tot de vijfde passage.

Ook hier kreeg ik een positief resultaat, hetgeen uit de tabel blijkt, en ook uit dit filtraat was een krachtige phag te kweken.

Deze beide positieve resultaten deden vermoeden, dat de beide oorspronkelijke culturen niet „ultra-rein” waren geweest. Daarom heb ik deze stammen onderzocht op de wijze door Flu aangegeven in de Acta Leydensia No. 1.

De laag bacteriën van vier schuine agar-culturen wordt afgespoeld met 3 cc physiologische zoutoplossing. Deze vloeistof wordt in een mortier met watervrij Natriumsulfaat gemengd tot een vaste massa ontstaat. Deze massa wordt gedurende een half uur gewreven in een mortier. Er ontstaat zoo een fijn poeder, dat in 100 cc bouillon wordt gesuspenderd. Deze suspensie wordt gedurende een uur bij 58° verhit, waarna de vloeistof over tien fleschjes wordt verdeeld, die elk 80 cc

TABEL II

	17	18a	18b	20	21	22	127	contrôle
bouillon	+	+	+	+	+	+	+	+
1 ¹ / ₂ ‰ agar	+	+	+	+	+	+	+	+
1.	O	O	O	O	O	O	O	
bouillon	+	+	+	+	+	+	+	+
agar	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	O	O	O	O	O	O	O	
bouillon	+	+	+	+	+	+	+	+
agar	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	O	O	O	O	O	O	O	
bouillon	+	+	+	+	+	+	+	+
agar	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	O	O	O	O	O	O	O	
bouillon	+	—	+	+	+	+	+	+
agar	+	pl	+	+	+	+	+	+
5.	O	O	O	O	O	O	O	

+

—

pl

O

bouillon bevatten. Die fleschjes worden met verschillende lysabele homologe stammen geënt en gedurende twee weken bij 37° gezet. Nu wordt elk fleschje apart gefiltreerd en het filtraat op phaag-vorming onderzocht met verscheidene goed lysabele stammen.

De tabel geeft het resultaat van dit onderzoek, verricht met Shiga 142 en Flexner 18.

TABEL III

No. van het fleschje	Fleschjes met bouillon bevattende de verwarmde suspensie van 142 gewreven met Na_2SO_4 en geënt met:					Fleschjes met bouillon bevattende de verwarmde suspensie van 18 gewreven met Na_2SO_4 en geënt met:		
	Phaagvorming tegen:					Phaagvorming tegen:		
	135,	136,	137,	138,	139	22,	122,	123.
	135,	136,	137,	138,	139	22,	122,	123.
1	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—

Daar deze contrôle dus toch duidde op een zuivere stam, heb ik dezelfde experimenten herhaald met opnieuw gevormde R-koloniën van culturen door Flu in lithiumchloride gekweekt en wel van de volgende stammen:

Shiga 16, 18, 127.

Flexner 142.

Y. 15.

Van elk der Shiga's 2 R-koloniën, van de Flexner 142: 9 R-koloniën en van de Y 15: 6 R-koloniën.

Al deze koloniën werden in bouillon geënt, ongeveer drie weken bij 37° bewaard. De bouillon werd gefiltreerd en het filtraat op de gebruikelijke manier op bacteriophagvorming onderzocht. Ook met deze reeks werd voortgegaan tot de vijfde passage.

Ditmaal viel geen positief resultaat te boeken.

Oogenschijnlijk dus twee positieve gevallen in deze serie. Ter zelfder tijd echter, maakten omstandigheden het noodzakelijk, dat ik met een shigaphaag werkte. Daarom wil ik de mogelijkheid van een contaminatie niet uitsluiten. Nog een reden voor deze zienswijze vind ik het feit, dat een herhaling der proeven geen resultaat heeft opgeleverd.

Een vierde reeks experimenten werd ingezet, uitgaande van R-koloniën van verschillende herkomst, n.l. uit lithium-chloridebouillon en van oude culturen. Deze koloniën werden in bouillon geënt, drie weken bewaard bij 37°, daarna gefiltreerd en het filtraat weer op de gebruikelijke wijze onderzocht op het lytisch vermogen.

Het betreft nu van Shiga 121 één R-kolonie, van Shiga 122: 2 R-koloniën, van een P.T.B. 2 R-koloniën, van een Typhus één R-kolonie, van een Flexner één R-kolonie, van Cholera 13 twee R-koloniën en van Cholera 132 eveneens twee R-koloniën.

Ook hier viel het onderzoek negatief uit.

PROEF IV. (VOLGENS PLANTUREUX I)

Zooals ik reeds in de bespreking van de literatuur opmerkte, tracht Plantureux door de toevoëging van electrolyten de bacterie-colloïden van electrisch teeken te doen veranderen. Hierdoor zouden ze zich tevens uit de samenhang van de cel bevrijden en vrij in de vloeistof komen. Dit zouden dan de bacteriophagen zijn. Zijn resultaten zijn benijdenswaardig.

Ziehier de gevolgde techniek.

„Aan 5 buisjes met 5 cc bouillon, die geënt zijn met een dysenterie cultuur tot een lichte troebeling zichtbaar is, voegt men toe respectievelijk 2, 4, 8, 15, 30 droppels van een 2% calcium-chloride oplossing en zet ze in de stoof bij 37° C. Iedere zes à zeven dagen wordt uit deze buisjes geënt op schuine agar en de colonie vorm bestudeerd. Reeds spoedig, meestal bij de tweede passage, treden abnormale koloniën op. De meest afwijkende in groeiwijze wordt in bouillon (pH 7.8) geënt, twintig dagen bij 37° C. bewaard en daarna gefiltreerd. Het filtraat bevat een bacteriophaag, die gewoonlijk krachtig genoeg is om een bouillon cultuur op te helderen.”

Dit voorschrift is letterlijk gevolgd. Professor Flu heeft de

abnormale kolonie gekweekt en ik heb ze verder op bacteriophagvorming onderzocht door van het filtraat in bouillon te enten, die licht troebel was door de erin geënte bacteriën. Bovendien werd dit mengsel uitgestreken op 1½ % agar om eventueele plage-vorming te herkennen. Was het resultaat negatief, dan werd de bouillon gefiltreerd en het filtraat weer op de beschreven wijze onderzocht. Hiermee is voortgegaan tot vijf passages waren geschied.

Geen bacteriophag werd gevonden. Onderzocht werden de volgende Shiga stammen: 15, 16, 17, 121, 122, 123, 124, 126.

Een gedeelte van de stammen, waarvan de abnormale kolonie in bouillon geënt werd, was geagglutineerd gegroeid. Dit is een kenmerk, dat verscheidene onderzoekers naar voren brengen bij het beschrijven van de culturen, waaruit het hun is gelukt, het lytisch principe af te zonderen.

PROEF V. (VOLGENS PLANTUREUX II)

Deze serie is een poging tot navolging van de proeven van Plantureux, waarbij hij zijn culturen kweekt in een sterk alcalisch milieu. In de literatuurbespreking meldde ik reeds, dat de groote meerderheid van deze culturen te gronde was gegaan. Slechts in eenige buisjes, waarin één, twee en drie druppels normaal loog was gedruppeld, was groei waar te nemen, en uit deze buisjes konden bacteriën worden uitgestreken over agarplaten.

De uitvoering van de proef is als volgt:

Tien buisjes elk 5 cc bouillon bevattend (pH = 7.3), worden geënt met een druppel cultuur. Daarna wordt in de eerste 1 druppel normaal NaOH, in de tweede 2 druppels loog, in de derde 3 druppels loog enz. gedaan. Op deze manier worden alle te onderzoeken culturen behandeld. Nu komt het geheel in de stoof bij 37° C. Elke 6 à 7 dagen wordt van de bouillon wat uitgestreken op platen en nagegaan of de door Plantureux beschreven afwijkende groeiwijze optreedt. Is dit het geval, dan wordt deze kolonie in bouillon gesuspenseerd en na twintig dagen verblijf in de stoof verder onderzocht. De bouillon wordt gefiltreerd en het filtraat nagekeken op aanwezigheid van bacteriophagen, zooals ik dat in de vorige proef

volgens *Plantureux* heb beschreven. Ook met deze serie is doorgegaan tot en met de vijfde passage.

Positieve resultaten heeft dit onderzoek niet opgeleverd.

Onderzocht werden de shiga stammen: 15, 16, 17, 122, 123, 124, 126. Zooals ik reeds opmerkte zijn de meeste bouillon-buisjes met loog, steriel gebleven.

Het eerste buisje is gegroeid van Shiga, 15, 16, 122, 123, 124, 126,; het tweede buisje van Shiga 16, 126,; het derde buisje alleen van Shiga 17.

Al deze uitstrijken hebben abnormale kolonien gegeven, waarvan echter alleen die van Shiga 122 en 126 (1 dr.) geagglutineerd groeiden. De andere groeiden wel niet met een egale troebeling van de bouillon, doch de uitgezakte massa was niet samengeklonterd. Professor *Flu* heeft het onderzoek verricht tot aan de filtratie, waarna ik het verder heb afgemaakt.

PROEF VI (VOLGENS DEN DOOREN DE JONG)

De feiten, door *den Dooren de Jong* medegedeeld, zijn ontegenzeggelijk juist, hetgeen ook wel daaruit blijkt, dat een ieder ze heeft kunnen herhalen met dezelfde uitkomst. Op zijn conclusies echter is kritiek uit te oefenen en wel de volgende:

Den Dooren de Jong verhit de sporen van de bacillus *Megatherium* tot 100° C. en doodt op deze wijze de asporogene bacteriën en de bacteriophag, die vrij in de vloeistof voorkomen. De phaag-partikeltjes, in de sporen ingedrongen, sterven volgens hem eveneens, doch hier komt het verschil in opvatting. Waarom zouden factoren, die wel in staat blijken het plasma van de spore te beschermen tegen een dusdanig hooge temperatuur, niet eveneens ingedrongen bacteriophagpartikels van den ondergang door verhitting kunnen redden?

Uitgaande van deze veronderstelling heb ik een serie proeven opgezet, die ik hier laat volgen.

Mijn positieve resultaten bij de proeven van *Hadley* zouden eventueel kunnen worden toegeschreven aan eene verontreiniging, te meer omdat te gelijk met mijn onderzoek in hetzelfde vertrek met een Shiga-phaag werd geëxperimenteerd.

Om een dergelijke verontreiniging te voorkomen heb ik bij deze reeksen gebruik gemaakt van een pest- of een megathe-

riumbacteriophaga. Ik mocht redelijkerwijs veronderstellen, dat deze beide niet in het laboratorium zouden rondzweven.

Ik ben begonnen met een voldoende hoeveelheid pestbacteriophaga te bereiden en deze aan zijden draadjes te drogen. Hiertoe werden deze draadjes gedompeld in de phaaghoudende bouillon, waarna alles werd uitgegoten in een petrischaal en in een luchtstroom van 42° C. werd ingedampt. Vervolgens werden de draadjes nog in het luchtledige boven ongebluschte kalk nagedroogd. Ik mocht er dus wel van overtuigd zijn, dat de draadjes hierna geen vocht meer bevatten.

Allereerst heb ik bepaald bij welke temperatuur deze bacteriophagen worden vernietigd.

Gaat men na wat in de laatste jaren gepubliceerd is over de thermoresistentie van bacteriophagen, dan vinden wij nogal tegenstrijdige mededeelingen. De meest afwijkende vondsten zijn wel die van H a u d u r o y (36a). Hij is bovendien de eerste, die vermeldt, dat er een verschil bestaat tusschen de inactiveringstemperatuur en die van vernietiging. De eerste temperatuur zou volgens hem liggen bij ongeveer 80° C., doch zou deze variëren al naar gelang de virulentie van de phaag.

De tweede temperatuur zou voor allen gelijk, doch afhankelijk zijn van het milieu, waarin de verhitte plaats vindt. Zij zou voor een vochtige omgeving $\pm 102^{\circ}$ C. bedragen, voor een droge omgeving 132° C.

Reeds dadelijk hebben deze mededeelingen tegenspraak verwekt. De eersten die er tegen opgekomen zijn, zijn wel geweest T c h a n g-K o u o-N g e n en W a g e m a n s (74). Zij erkennen dat de inactiveringstemperatuur voor verschillende bacteriophaga-culturen een andere is, doch kunnen geen verschil aantonen tusschen deze en de afstervingstemperatuur, die volgens hen bij $\pm 80^{\circ}$ C. ligt.

Een afdoende kritiek heeft F l u (21) op de proeven van H a u d u r o y uitgeoefend. Hij bewijst experimenteel, dat de vondsten van H a u d u r o y te wijten zijn aan fouten in zijn techniek. De wanden der open buizen, waarin H a u d u r o y zijn proeven heeft genomen, waren niet voldoende verhit om de eraan klevende phagen te doden; de vloeistof werd van hier uit weer besmet. d' H e r e l l e (39) wijst er bovendien nog op, dat de verhitte zoo kort van duur was, dat de geheele inhoud

der buis onmogelijk de temperatuur van het waterbad had kunnen aannemen.

In de zelfde mededeeling van Flu becriticeert hij de proeven van Seiffert over de reactivering door filtratie. De resultaten door hem bij de contrôle der mededeeling van Seiffert bereikt (pag. 10) vermeldde ik reeds in mijn litteratuur overzicht. De publicatie van Seiffert, dat de phaag een verhitting tot 100° C. zou doorstaan, berust dus eveneens op een fout in de door deze toegepaste techniek.

Een bevestiging van de vondsten van d'Herelle, Flu en anderen, kunnen wij zien in de publicaties van de laatste jaren. Alle mededeelingen over afstervingstemperaturen van bacteriophagen vermelden cijfers, die liggen tusschen 60° en 75° C.

Ik wil in dit verband alleen noemen de publicaties van Grigorieff (28), Söhlgen en Grijns (68a) en Nanavutty (53a).

De door mij gevolgde werkwijze is de volgende geweest.

Zes buisjes met bouillon werden in een waterbad tot 80° C. verhit. De temperatuur werd gecontroleerd door middel van een thermometer geplaatst in een zevende, eveneens met bouillon gevuld buisje.

Nu werden zes draadjes middendoor geknipt. De eene helft werd in de warme bouillon gebracht, de andere, ter contrôle, in onverhitte bouillon. Telkens na 5 minuten werd een buisje uit het bad genomen en snel afgekoeld in water. Daarna werden alle buisjes, benevens een controle buisje, geënt met pestbacteriën. Den volgenden dag bleken alle onverhitte buisjes en de buisjes die 5 en 10 minuten verhit waren geweest, helder geworden. Twee herhalingen van de proef gaven nog fraaier resultaat. Zelfs 20 minuten verhitten had de phaag niet vernietigd. Daar dit resultaat al zeer weinig overeenkwam met de gegevens uit de literatuur, herhaalde ik dezelfde proef nog drie maal, echter met deze afwijking, dat de buisjes werden dichtgesmolten en geheel ondergedompeld werden verhit. Nu bleek dat verhitting gedurende 5 minuten bij 80° C. reeds voldoende was om de phaag te vernietigen.

Een herhaling met de toegesmolten buisjes, doch nu bij opklimmende temperaturen van 60° tot 80° C., met sprongen van 5°, deed zien, dat een verhitting gedurende 5 min. bij 70° tot

vernietiging leidde. Alles verliep dus geheel volgens de verwachting.

Bij de volgende proef heb ik getracht de phaag in ongeveer dezelfde omstandigheden te brengen, waaronder zij in een spore verkeert.

Daartoe heb ik de droge draadjes met een collodionlaagje omhuld. De draadjes werden in een collodion-oplossing gebracht en deze onder de klok van de luchtpomp ingedampt. Hiermee trachtte ik te bereiken, dat de draden geen vocht en geen lucht zouden bevatten.

Deze draden werden eveneens in bouillon bij 80° C. verhit. Evenals bij de vorige serie, werd elke 5 minuten een buisje uit het waterbad genomen en afgekoeld.

Nu werden de draadjes uit de bouillon gehaald, in stukjes geknipt en er weer in teruggebracht. Alle buisjes, verhitte zoowel als onverhitte, werden met pest geënt en de volgende dag op phaagwerking onderzocht. Al de onverhitte waren helder geworden, de verhitte niet. Een herhaling leverde hetzelfde resultaat op.

Bij de nu volgende serie heb ik de temperatuur waarbij de pestphaag afsterft bij droge verhitte en in het toestel van Koch, nagegaan, zoomede die waarbij de sporen van bacillus megatherium gedood worden. Mocht het immers blijken, dat bij bedoelde verhitte de phaag resistenter was dan de spore, dan zou dit een belangrijke steun voor de vooropgezette veronderstelling zijn. De proeven van H a u d u r o y waren hiervoor een aansporing en een aanwijzing.

De uitkomsten hebben deze veronderstelling niet bevestigd. De sporen waren voor dit experiment op dezelfde wijze als de phaag aan draadjes gedroogd. Deze draadjes werden in buisjes, die met een gummidop gesloten waren, in het toestel van Koch en in de stoof gebracht. Het verhitten geschiedde bij 100° C. terwijl onderscheidenlijk na 5, 10, 20, 30, 40 en 60 minuten een buisje werd uitgenomen.

Hierbij bleek, dat de sporen de verhitte gedurende 40 minuten konden verdragen. De bacteriophag was reeds na 5 minuten vernietigd.

Langs dezen weg kwam ik dus niet tot het doel en besloot

nu tot een rechtstreeksche methode, waarbij ik uitging van de volgende gedachte.

Elke spore van den stam 899 levert bij ontkieming een bacteriophag, onverschillig of de spore tot 90° dan wel tot 100° C. verhit wordt en ongeacht de duur van de verhitting, mits slechts de spore de behandeling overleeft. Veronderstel ik nu dat de phag in de spore reeds aanwezig is en door de spore tegen vernietiging wordt beschermd, daar mag ik ook de mogelijkheid verwachten de spore te kunnen dooden zonder dat de phag verdwijnt.

Ik heb eerst een proefserie ingezet. In 5 bouillonbuisjes werd een draadje met megatheriumsporen ondergedompeld, waarna de buisjes werden verhit. Het eerste tot 90° , het tweede tot 100° C., het derde 5 minuten bij 100° C., het vierde 10 minuten bij 100° C. en het vijfde 15 minuten bij 100° C. De vijf busjes werden hierop gedurende vier dagen in de stoof gezet bij 37° C. om de overlevende sporen gelegenheid te geven te ontkiemen.

Na vier dagen vertoonde alleen het eerste buisje groei. Dit werd dus weggezet. De overige vier buisjes werden gefiltreerd door Chamberland L.3. Het filtraat werd in bouillon geënt. Tevens bracht ik hierin eenige druppels van den stam 338b van den Dooren de Jong. Deze stam werd eveneens uitgestreken over peptonager. Nadat de culturen een uur waren gegroeid liet ik een druppel filtraat over de oppervlakte van de agar loopen. Den volgenden dag waren alle bouillonculturen even troebel als de contrôlecultuur. Op de agar-buisjes echter had de druppel van het filtraat van het vierde buisje (10 min. bij 100° C.) een helder spoor achtergelaten. De bouillon werd thans gefiltreerd en het filtraat in verse bouillon geënt. Verder werd gehandeld op de hierboven beschreven wijze. Na één dag vertoonden de eerste drie buisjes geen verschil met de contrôle; nu was evenwel het vijfde buisje (15 mnuten bij 100° C.) helder geworden en ook de agar vertoonde plages en een heldere baan op de plaatsen waar de druppel langs was gelopen.

Ik heb toen nog een passage verricht. Nu waren alle bouillonbuisjes troebel en slechts het vierde agar-buisje vertoonde plages. Blijkbaar had het agens aan kracht verloren, doch in elk geval had ik toch een bacteriophag gevonden.

De buisjes waarin de sporen waren verhit, had ik om even-

tueele fouten uit te sluiten, tot aan de watteprop in het water ondergedompeld; zodoende waren de buizen een heel eind boven de bouillon-oppervlakte nog door water omgeven. Toch heb ik in deze wijze van behandeling geen vertrouwen gesteld, gezien mijne bevinding bij de pest-bacteriophaga. Daarom heb ik alles nog eens herhaald met toegesmolten buisjes, die een suspensie van 899 in bouillon bevatten.

Deze buisjes zijn, met uitzondering van drie controle-buisjes, geheel ondergedompeld verwarmd, en wel vijf tot 95° C., vijf gedurende 5 minuten bij 95° C., vijf tot 100° C., vijftien gedurende 5 minuten bij 100° C., twintig gedurende 10 minuten bij 100° C. en twintig gedurende 15 minuten bij 100° C.

De buisjes hebben daarna vier dagen in de stoof gestaan, om de sporen gelegenheid te geven te ontkiemen.

Na verloop van dezen tijd waren de controlebuisjes troebel en was in de buisjes, die tot 95° C. waren verhit, groei te bespeuren.

Nu werden de buisjes geopend, geschud en van de vloeistof van ieder buisje een druppel over een buisje met agar verspreid. Den volgenden dag bleek, dat nu ook de inhoud der buisjes die 5 minuten bij 95° C. waren verhit, niet steriel was, daar op de agar een kolonie megatherium was gegroeid.

De overige agarcontroles waren steriel gebleven. Ik mocht dus ook de oorspronkelijke bouillon wel als zoodanig beschouwen.

In deze bouillon, heb ik de stam 338b geënt en alles weer drie dagen bij 37° C. bewaard.

Daarna heb ik de bouillon gefiltreerd en elk der filtraten op bacteriophagavorming onderzocht.

De resultaten zijn negatief geweest.

Tegelijkertijd werd een tweede serie ingezet. Hierbij ging ik op de volgende wijze te werk.

Een suspensie van stam 899 werd in een breede, platte kolf met een lange, nauwe hals verhit. De kolf was geheel in de vloeistof ondergedompeld. Het waterbad werd op 95° C. gebracht en nu werd elke 5 minuten met een pasteurpipet een gedeelte van de suspensie opgezogen en in peptonwater geënt. Zorgvuldig werd er op gelet, dat de pipet de wanden van de hals niet aanraakte.

Op deze wijze maakte ik seriën van tien buisjes met sporen, welke verschillende tijden bij 95° C. waren verwarmd en wel respectievelijk gedurende 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 en 55 minuten. Ook deze buisjes hebben vier dagen in de stoof gestaan, om de sporen gelegenheid te geven te ontkiemen. Groei werd geconstateerd in de serie die 5 minuten was verhit en verder in iedere serie van 20, 25 en 35 minuten in één buisje. Deze buisjes werden verwijderd.

De rest werd geënt met stam 338b en weer in de stoof geplaatst. Drie dagen later heb ik deze buisjes gefiltreerd en het filtraat onderzocht. Er was geen bacteriophag aan te toonen.

Daarna heb ik nog een laatste serie ingezet met sporen aan draden gedroogd. De opzet kwam geheel overeen met die van de proefserie (blz. 41), alleen heb ik nu de buisjes dichtgesmolten en een grooter aantal verhit, n.l. 5 buizen voor elke tijdsduur.

Ook deze experimenten hebben geen bacteriophag opgeleverd.

SAMENVATTING

Als ik aan de hand van de onderzoeken, in dit proefschrift beschreven, de vraag zal moeten beantwoorden, die de titel van dit boekje vormt, dan zal ik geen positief ja of neen kunnen neerschrijven.

Overzie ik de uitkomsten, dan blijken er niet meer dan twee positieve te zijn in de experimenten, die ik in navolging van H a d l e y heb verricht. Zooals ik echter reeds ter plaatse heb vermeld, hebben deze resultaten voor mij slechts een geringe waarde. Ik kan een contaminatie niet uitsluiten, en waar mijn persoonlijk inzicht over dit vraagstuk in strijd is met de opvatting, die in de bacteriophag een bacterieproduct ziet, hebben bedoelde twee positieve uitkomsten mijn opinie niet kunnen wijzigen, al hebben de onderzoekers, die een andere opvatting huldigen, bij gelijksoortige proeven een zeer groot percentage, soms de honderd naderende, positieve resultaten gehad.

Tegenover hen, die eene andere meening zijn toegedaan, mag ik ze echter niet negeeren. Ik heb alle voorzorgen in acht genomen en ben mij steeds van het gevaar van een contaminatie bewust geweest.

Willen de onderzoekers, die de phag als bacterieeigen beschouwen, deze onderzoeken dus in hun richting uitleggen, dan kan ik hun dat recht niet ontzeggen.

In het overzicht van de literatuur valt de mededeeling op, dat men er meestentijds slechts met enkele stammen in slaagt, een bacteriophag te winnen. Wil men mijn vondsten waarde toekennen, dan blijkt toch ook uit mijne experimenten dat het slechts zeer enkele sammen zijn, die een phag hebben voortgebracht. Bovendien blijkt eruit, dat dit zeer zeker afhankelijk moet worden geacht van onbekende factoren. Immers, een herhaling van de proef onder oogenschijnlijk geheel dezelfde omstandigheden, leverde niets op.

De proeven van den D o o r e n de J o n g heb ook ik weer kunnen bevestigen. Bovendien hebben al mijn pogingen om een

anderen uitleg aan zijn bevindingen en vooral aan zijn theorie te geven en voor dezen uitleg bewijsgronden te vinden, gefaald. Integendeel, duiden al mijn experimenten eerder in de door hem aangegeven richting.

Tot mijn spijt ontbrak mij de noodige tijd om de experimenten van Cowles te herhalen. Dit is momenteel de eenige mededeeling, die met die van den Dooren de Jong in strijd is.

Als eenig positief resultaat kan misschien beschouwd worden, dat nogmaals ten duidelijkste is aangetoond, dat de grootste voorzorgen geboden zijn bij het werken met bacteriophagen.

Het onderzoek naar het gedrag van de phaag bij hogere temperaturen moet, zoo mogelijk, in gesloten buizen worden verricht. Het niet voldoen aan dezen eisch verklaart mijns inziens, waarom de onderzoekers groote verschillen in de uitkomsten vermelden.

Over de proeven volgens Plantureux en Rosenthal spreek ik in deze samenvatting niet, omdat naar mijne meening, die van Plantureux zich geheel bij die van Hadley aansluiten, terwijl ik reeds aan het eind van de beschrijving der experimenten volgens Rosenthal tot een besluit ben gekomen, waaraan ik hier niets meer heb toe te voegen.

Mijn conclusies luiden dus:

De mogelijkheid van vorming van een bacteriophagaag uit bacteriophagvrije culturen kan voor de megatherium van den Dooren de Jong niet ontkend worden.

Deze eigenschap mag niet aan elke bacterie worden toegekend, doch moet beschouwd worden als een uitzonderingsgeval.

De bacteriophagaag wordt in een bouillonoplossing vernietigd bij een temperatuur van $\pm 75^{\circ}$ C.

Men neme bij een onderzoek over bacteriophagen de grootste voorzorgen tegen een mogelijke contaminatie.

LITERATUUROPGAVE

- 1 ANCIAUX, L. C. R. d. Soc. d. Biol. 1931, 106, p. 489.
- 2 ASHESHOV, J. N. J. of Inf. dis. 1924, 34, p. 536.
- 3 BORDET, J. C. R. d. Soc. d. Biol. 1925, 93, p. 1054.
- 4 — C. R. d. Soc. d. Biol. 1925, 93, p. 1432.
- 5 — C. R. d. Soc. d. Biol. 1924, 90, p. 96.
- 6 — Ann. d. l'Inst. Past. 1924, 39, p. 717.
- 7 — Ann. d. l'Inst. Past. 1928, 42 p. 1283.
- 8 BAIL, O. Arch. f. Hyg. 1923, 92, p. 251.
- 9 — D. Med. W. 1925, p. 13.
- 10 BORCHARDT. Ztschr. f. Imm. frsch. O. 1923, 37, p. 1.
- 11 BECHHOLD. H. Ztschr. f. Hyg. 1923, 99.
- 12 — Umschau. 1930, 34, p. 121.
- 13 BURNET. J. of Path. 1930, 33, p. 657.
- 14 DA COSTA CRUZ. C. R. d. Soc. d. Biol. 1927, 97, p. 837.
- 15 COWLES, Ph. B. J. of Bact. 1930, 20, p. 15.
- 16 — J. of Bact. 1931. 12.
- 17 DOERR EN GRUENINGER. Ztschr. f. Hyg. 1922, 97, p. 209.
- 18 DEN DOOREN DE JONG. Ztbl. f. Bakt. O. 1931, 120, p. 1.
- 19 — Ztbl. f. Bakt. O. 1931.
- 20 FLU, P. C. Ztbl. f. Bakt. O. 1923, 90, p. 362.
- 21 — Acta Leidensia. 1926. I. p. 41, 87, 91, 101.
- 22 — Ztbl. f. Bakt. O. 1925, 97, p. 1.
- 23 — Ztbl. f. Bakt. O. 1929, 113, p. 284.
- 24 FUKUDA, Y. Ztschr. f. Imm. frsch. 1928, 54, p. 369.
- 25 GILDEMEISTER en
- 26 HERZBERG, L. Ztbl. f. Bakt. O. 1924, 93, p. 402.
- 27 GOSH, W. Ztschr. f. Imm. frsch. 1925, 45, p. 141 en p. 269; 1926, 49, p. 17, 412, 532, 139.
- 28 GRIGORIEF, A. C. R. d. Soc. de Biol. 1927, 96, p. 1141.
- 29 GJORUP, E. Ztbl. f. Bakt. R. 82.
- 30 GUTFELD, Fr. v. Klin. Wochenschr. 1929, p. 2217.
- 31 HAJOS. Ztschr. f. Imm. frsch. O. 1923, 37, p. 147.
- 32 HADLEY, PH. J. of Inf. Dis. 1924, 34, p. 260.
- 33 HADLEY, PH. en
KLIMER, J. Proc. Soc. f. exper. Biol. and Med. 1927, 25, p. 34.
- 34 HADLEY, PH. J. of Inf. Dis. 1927, 40, p. 1.
- 35 — J. of Inf. Dis. 1931, 48, p. 1.

- 36 — J. of Inf. Dis. 1931, 48, p. 176.
- 36a HAUDUROY, P. C. R. d. Soc. d. Biol. 1922, 87, p. 1089.
- 37 D'HÉRELLE, F. C. R. d. Soc. d. Biol. 1925, 93, p. 1206.
- 38 — The Bacteriophage and its clinical Application.
- 39 — Le Bacteriophage et son Comportement.
- 40 — C. R. d. Soc. d. Biol. 1930, 104, p. 1254.
- 41 HODER, F. Ztschr. f. Imm. frsch. 1925, 42, p. 197.
- 42 HODER, F. en SUZUKI Ztbl. f. Bakt. O. 1926, 98, p. 433.
- 43 KUTTNER. J. of Bact. 1923, 8, p. 49.
- 44 KELLER. Ztschr. f. Hyg. 1924, 103, p. 177.
- 45 KUHN, PH. Arch. f. Schiffs Hyg. 1926, Beih. 30, p. 133.
- 46 — Ztbl. f. Bakt. O. 1931.
- 47 LISBONNE EN CARRÈRE. C. R. d. Soc. d. Biol. 1924, 90, p. 265.
- 48 LEITNER. Ztschr. f. Imm. frsch. 1928, 57, p. 50.
- 49 MALLMANU, W. L. J. of Bact. 1925, 10, p. 59.
- 50 MUCKENFUSZ, R. S. J. of exp. Med. 1928, 48, p. 723.
- 51 MEULL. H. Ztschr. f. Hyg. 1923, 99, p. 46.
- 52 MUNTER, H. Ztbl. f. Hyg. 1930, 23, p. 1.
- 53 MANNINGER, R. Ztbl. f. Bakt. O. 1926, 99, p. 203.
- 53a NANAVUTTY, S. H. J. of Path. a. Bact. 1930, 331, p. 203.
- 54 OTTO EN MUNTER. Ztschr. f. Hyg. 1922, 98, p. 203.
- 55 OGATA, N. Ztbl. f. Bakt. O., 1924, 93, s. 329.
- 56 PRAUSNITZ, C. Ztbl. d. Bakt. O. 1928, 106, s. 300.
- 57 PLANTUREUX, E. C. R. d. Soc. d. Biol. 1929, 103, p. 387, 389, 488, 491.
- 58 — C. R. d. l'Ac. d. Sciences 1930, 190, p. 224.
- 59 — Ann. d. l'Inst. Past. d'Alg. 1931, 9, p. 113.
- 60 PONDMAN, A. B. F. A. Proefschr. Leiden 1923. Uitg. de Boer, den Helder.
- 61 PFALZ, G. J. Ztbl. f. Bakt. O. 1926, 101, p. 209.
- 62 ROSENTHAL. P. C. R. d. Soc. d. Biol. 1930, 105, p. 351.
- 63 SEIFFERT, W. Ztschr. f. Hyg. 1922, 98, p. 482.
- 64 — Ztschr. f. Immfrsch. O. 1923, 38, p. 292.
- 65 — D. Med. Wochenschr. 1925, p. 350.
- 66 SUMIYOSHI. Ztschr. f. Imm. frsch. O. 1923, 39, p. 377.
- 67 SCHUURMAN, C. J. Proefschr. Leiden 1925. Uitg. v. Doesburg, Leiden.
- 68 — Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microb. en Serologie, 1931, 5, p. 30.
- 68a SOEHNGEN en GRIJNS. Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microb. en Serologie, 1927, 1, p. 96.
- 69 THOMAS MARIE. Ztschr. f. Imm. frsch. 1929, 63, p. 521.
- 70 WEINBERG en AZNAR. C. R. d. Soc. d. Biol. 1922, 86, p. 833.
- 71 WOLLMAN, E. C. R. d. Soc. d. Biol. 1924, 90, p. 59.
- 72 WOLLMAN, E. et WOLLMAN E. C. R. d. Soc. d. Biol. 1930, 105, p. 248.
- 73 WOLFF, L. Ztschr. f. Imm. frsch. 1926, 45, p. 507.
- 74 WAGEMANS en TCHANG-KOUO-NGEN. C. R. d. Soc. d. Biol. 1923, 88, p. 303.

STELLINGEN

I

Experimenten over thermoresistentie van bacteriophagen behoreen te worden verricht in gesloten, nauwe buizen, die geheel door het verwarmende medium zijn omgeven.

II

De daling van het gewicht van den pasgeborene is een gevolg van een pathologische exsiccose. Men drage daarom zorg voor een voldoende opname van vocht.

III

Het klinische beeld van de nephritis is hoofdzakelijk een gevolg van een weefselbeschadiging; de nierfunctie en de retentie van afvalproducten is van secundaire aard.

IV

De verklaring door Mond gegeven van de selectieve anionen-permeabiliteit van de erythrocytenmembraan is onjuist.

V

Evenals bij spieren bestaat ook bij pezen een betrekking tusschen histologischen bouw en functie.

VI

Van de moderne reacties op lues verdient de Meinicke K.R. de voorkeur door haar eenvoud en door haar specificiteit. De snelreactie is zeer bruikbaar ter klinische oriëntatie.

VII

Indien zorg kan worden gedragen voor een nauwkeurige controle, verdient het ongewatteerde gipsverband de voorkeur boven het gewatteerde.

VIII

Vertoont een otitis-media bij een oordeelkundige behandeling geen neiging tot genezing, dan overwege men na vier à zes weken een antrum-drainage.

IX

Voor den arts in Europa is kennis van de voornaamste tropische ziekten een vereischte.

X

Men late zich bij de behandeling der diphterie leiden door de klinische gegevens. De bacteriologische diagnose heeft slechts epidemiologische beteekenis.

INHOUD

I. INLEIDING	1
II. LITERATUUROVERZICHT	3
III. EIGEN ONDERZOEK	25
IV. SAMENVATTING EN GEVOLGTREKKINGEN	44
V. LITERATUUROPGAVE	47
VI. STELLINGEN	49

